

Definition des regulatorischen Netzwerkes von *Pseudomonas aeruginosa* zur Anpassung an anaerobe Lebensbedingungen

Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

**von Katharina Trunk
aus München**

1. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis

eingereicht am: 8. 9. 2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15. 12. 2005

Druckjahr: 2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch Prof. Dr. D. Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. und Schobert, M. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. J Bacteriol. 186: 4596-4604 (2004).

Trunk, K., Quäck, N., Münch, R., Eschbach, M., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, D. und Schobert, M. Two redox regulators – one DNA binding site: definition of the *Pseudomonas aeruginosa* Anr and Dnr regulons. (eingereicht zur Publikation, Mol Microbiol).

Tagungsbeiträge

Eschbach, M., Quäck, N., Trunk, K., Hentzer, M., Giskov, M., Jahn, D. und Schobert, M. The role of the anaerobic regulatory network in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. (Poster) VAAM Jahrestagung, Göttingen (2002).

Trunk, K., Eschbach, M., Münch, R., Quäck, N., Jänsch, L., Wehland, J., Jahn, D. und Schobert, M. Definition of the Anr and Dnr regulon for oxygen tension adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* using an integrated proteomics, genomics and bioinformatic approach. (Poster) VAAM Jahrestagung, Berlin (2003).

Trunk, K., Eschbach, M., Münch, R., Quäck, N., Jänsch, L., Wehland, J., Jahn, D. und Schobert, M. Definition of the Anr and Dnr regulon for oxygen tension adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* using an integrated proteomics, genomics and bioinformatic approach. (Poster) NGFN Genom Kongress, Tübingen (2003).

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Mukoviszidose	1
1.1.2 Virulenzfaktoren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.2.1 Sekretionssysteme zur Freisetzung der Virulenzfaktoren	4
1.1.2.2 Regulation der Bildung einiger Virulenzfaktoren über Quorum Sensing	6
1.2 Der Energiestoffwechsel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.2.1 Sauerstoffatmung mittels distinkter terminaler Oxidasen	9
1.2.2 Die Dentrifikation	10
1.2.3 Energiegewinnung mittels Fermentation	13
1.2.3.1 Die Argininfermentation	13
1.2.3.2 Die Pyruvatfermentation	14
1.2.4 Die Regulation des anaeroben Energiestoffwechsels	15
1.2.4.1 Das Nitratsensorsystem NarXL	15
1.2.4.2 Die Transkriptionsregulatoren Anr und Dnr	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien und Materialien	20
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	20
2.3 Medien und Medienzusätze	23
2.3.1 Komplexmedium	23
2.3.2 Halb-definiertes Medium OS	23

2.3.3	Minimalmedium	24
2.3.4	Antibiotika	24
2.4	Mikrobiologische Techniken	25
2.4.1	Sterilisation	25
2.4.2	Plattenkulturen von Bakterien	25
2.4.3	Flüssigkulturen von Bakterien	25
2.4.4	Bestimmung der Zelldichte	26
2.4.5	Lagerung von Bakterien	26
2.5	Molekularbiologische Methoden	26
2.5.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.5.2	Restriktion von DNA	27
2.5.3	Ligation von DNA	27
2.5.4	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	27
2.5.5	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	28
2.5.5.1	<i>Escherichia coli</i>	28
2.5.5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.5.6	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.5.7	Diparental-Mating zur Transformation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.5.8	Southern und Northern Blotting	30
2.5.8.1	Präparation chromosomaler DNA für den Southern Blot	30
2.5.8.2	Präparation von Gesamt-RNA	31
2.5.8.3	Bestimmung der DNA bzw. RNA-Konzentration	33
2.5.8.4	Herstellung der Sonde für den Southern Blot	33
2.5.8.5	Herstellung der Sonden für den Northern Blot	34
2.5.8.6	Elektrophoretische Auftrennung und Blotten der DNA bzw. RNA	35
2.5.8.7	Nukleinsäuren-Hybridisierung und Detektion	36
2.5.9	Transkriptomanalysen mittels <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GeneChips	37
2.5.9.1	Aufbereitung der RNA für die GeneChip-Hybridisierung	38
2.5.9.2	Auswertung der GeneChip-Hybridisierungen	39
2.6	Klonierungsstrategien	41
2.6.1	Konstruktion von <i>lacZ</i> -Reporterfusionen	41

2.6.2	Konstruktion von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Insertionsmutanten	42
2.6.3	Der β -Galaktosidase Enzymtest	43
2.7	Proteom-Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	45
2.7.1	Zellernte	45
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels dem BCA-Test	46
2.7.3	Zellaufschluss und Proteinfällung	46
2.7.4	Proteinbestimmung mit dem PlusOne 2D Quant Kit	47
2.7.5	Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten (IPG)	47
2.7.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.7.7	Fixierung und Färbung der Gele	49
2.7.8	Auswertung der zweidimensionalen Gele	49
2.7.9	Vorbereitung der zu analysierenden Proteine für die Massenspektrometrie	50
2.7.10	Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	51
3	Ergebnisse und Diskussion	53
3.1	Das anaerobe Regulon von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
3.1.1	Etablierung der Versuchsbedingungen	53
3.1.1.1	Bestimmung des Zeitpunkts der Zellernte unter aeroben und anaeroben Bedingungen	54
3.1.1.2	Bestimmung des Mediums zur Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> Zellen	56
3.1.1.3	Etablierung einer Methode der RNA-Präparation aus <i>P. aeruginosa</i> Zellen	57
3.1.2	Durchführung von Transkriptomanalysen mit <i>P. aeruginosa</i> GeneChips	58
3.1.3	Auswertung von Transkriptomanalysen mittels <i>P. aeruginosa</i> GeneChips	59
3.1.4	Transkriptomanalyse von <i>P. aeruginosa</i> -Zellen unter aeroben gegenüber anaeroben Wachstumsbedingungen	61
3.1.4.1	13 % der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen regulierten Gene von <i>P. aeruginosa</i> gehören dem Energiemetabolismus an	63
3.1.4.2	Die Regulation von 33 % der unter anaeroben Bedingungen regulierten Gene ist auf den durch anaerobe Inkubation zuvor aerober <i>P. aeruginosa</i> -Zellen verursachten Energiemangel zurückzuführen	66
3.1.4.3	Die Regulation von 23 % der unter anaeroben Bedingungen regulierten Gene ist auf Sauerstoffmangel zurückzuführen	68

3.1.4.4	31 % der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen regulierten Gene kodieren für hypothetische Proteine unbekannter Funktion	71
3.1.5	Promotoranalysen der zehn unter anaeroben Bedingungen am stärksten induzierten Operons mit Hilfe von Reportergenfusionen	72
3.1.6	Das Anr-Dnr-Regulon von <i>P. aeruginosa</i>	74
3.1.6.1	Unter anaeroben Bedingungen wurden 57 Gene durch Anr und 9 Gene durch Dnr induziert	76
3.1.6.2	Identifizierung von Anr-Bindesequenzen in potentiellen Promotorregionen Anr/Dnr-regulierter Gene	77
3.1.6.3	Unter anaeroben Bedingungen stehen 13 Gene unter der negativen Kontrolle der beiden Transkriptionsregulatoren Anr und Dnr	79
3.1.6.4	Weitere potentielle Anr-abhängige Gene	80
3.2	Charakterisierung anaerob induzierter potentieller regulatorischer Gene	83
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung von Insertionsmutanten 16 anaerob induzierter potentieller regulatorischer Gene	84
3.2.2	Proteomanalyse der Regulormutante DHpa3757	85
3.3	Untersuchung denitrifizierender und mikroaerober Chemostat-Kulturen von <i>P. aeruginosa</i>	89
3.3.1	Vergleichende Transkriptomanalyse denitrifizierender gegenüber mikroaerober <i>P. aeruginosa</i> Chemostat-Kulturen	91
3.3.1.1	Das differentielle Anr-Regulon denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostat-Kulturen	92
3.3.1.2	Die Konservierung der Anr-Bindesequenz übt keinen Einfluss auf die differentielle Regulation Anr-abhängiger Gene unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen aus	96
3.3.1.3	Die Gene der Nitratatmung sind unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert	98
3.3.1.4	Zwei Oxidasen des Typs <i>cbb₃</i> werden unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen gegensätzlich reguliert	101
3.3.1.5	Die Gene der Argininfermentation sind sowohl unter denitrifizierenden als auch mikroaeroben Bedingungen induziert	103
3.3.1.6	Regulation Quorum Sensing abhängiger Gene unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen	105
3.3.1.7	Die Transkription der Gene der Typ III Sekretion ist unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert	107
3.3.1.8	Unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen wurden 22 weitere Gene unterschiedlich reguliert	110
3.3.2	Vergleichende Proteomanalyse denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostat-Kulturen	112

4	Zusammenfassung	116
5	Ausblick	118
6	Literaturverzeichnis	119
7	Danksagung	136

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

2D	zweidimensional
A	absent
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHL	acyliertes Homoserinlaktat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BCA	bicinchonic acid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Carb	Carbenicillin
cDNA	copy DNA
CF	Cystische Fibrose
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
Cm	Chloramphenicol
D	decreased
DH	Dehydrogenase
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-)-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E _λ	Extinktion der Wellenlänge λ nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAP	GTPase aktivierendes Protein
Gm	Gentamycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HSL	Homoserinlaktat
I	increased
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilized pH-gradient
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
M	marginal
MALDI	matrix assisted Laser desorption/ionization
MD	marginal decreased
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
MI	marginal increased
min	Minute
MM	mismatch oligo
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

MS	Massenspektrometrie
MU	relative Einheit der β -Galaktosidaseaktivität (Miller Units)
NADH	Nicotinamid-adenosin-dinukleotid
NC	not changed
OD_λ	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ nm
oNPG	o-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid
ORF	open reading frame
P	present
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PM	perfect match oligo
PMF	proton motive force
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
QS	Quorum Sensing
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tc	Tetracyclin
TEMED	N, N, N, N-tetramethyl-ethylen-diamin
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
TOF	time of flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TTSS	Typ III Sekretionssystem
U	Units
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1: Schematische Darstellung von Lungenepithelzellen gesunder Menschen (A) gegenüber CF-PatientInnen (B).	2
Abb. 2: Schematische Darstellung einer <i>P. aeruginosa</i> -Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten und translozierten Virulenzfaktoren.	3
Abb. 3: Schematische Darstellung des Typ III-Sekretionssystems (TSS) aus <i>P. aeruginosa</i> .	5
Abb. 4: Schematische Darstellung des Quorum Sensing (QS)-Regulons in <i>P. aeruginosa</i> .	7
Abb. 5: Schematische Darstellung der aeroben Elektransportkette mit den fünf bekannten identifizierten terminalen Oxidasen der aeroben Atmung von <i>P. aeruginosa</i> .	10
Abb. 6: Schematische Darstellung der Denitrifizierung von <i>P. aeruginosa</i> .	12
Abb. 7: Schematische Darstellung der Arginin-Fermentation von <i>P. aeruginosa</i> .	14
Abb. 8: Schematische Darstellung der Pyruvatfermentation von <i>P. aeruginosa</i>	15
Abb. 9: Mechanismus des NarX/L-Regulationssystems.	16
Abb. 10: Schematische Darstellung der inaktiven und aktiven Formen des globalen anaeroben Transkriptionsregulators Anr.	17
Abb. 11: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers.	51
Abb. 12: Darstellung einer Wachstumskurve (A) von <i>P. aeruginosa</i> unter Durchführung eines Wechsels von aeroben zu anaeroben Bedingungen bei einer OD ₅₇₈ = 0.3 sowie eines Northern Blots (B) unter Verwendung einer nirS-Sonde.	55
Abb. 13: Darstellung der chromosomalen Anordnung der Gene <i>nirF</i> , <i>nirC</i> , <i>nirM</i> , <i>nirS</i> und <i>nirQ</i> unter Berücksichtigung ihrer Orientierung und unter Angabe ihrer jeweiligen Größe in Basenpaaren (bp) sowie der Größe eines hypothetischen <i>nirSMC</i> -Operons.	55
Abb. 14: Darstellung eines Northern Blots unter Verwendung einer <i>arcA</i> -Sonde (A) sowie schematische Darstellung des <i>arcDABC</i> -Operons (B).	56
Abb. 15: Darstellung zweier Scatter Plots. Plot A zeigt den Vergleich der Signalintensitäten der Transkripte zweier <i>dnr</i> -Mutanten-Kulturen (<i>dnr</i> 1 und <i>dnr</i> 2) unter anaeroben Bedingungen, Plot B ist die graphische Darstellung des Vergleichs der Signalintensitäten der Transkripte des Wildtyps PAO1 1 sowie der <i>anr</i> -Mutante 1 unter anaeroben Bedingungen.	60
Abb. 16: Einteilung der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten und reprimierten Gene nach der Stärke ihrer Regulation.	61
Abb. 17: Einteilung der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten (rot) und reprimierten (blau) Gene von <i>P. aeruginosa</i> in funktionelle Klassen (nach www.pseudomonas.com).	62
Abb. 18: β -Galaktosidaseaktivitäten in Miller Units von zehn Reportergenfusionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	73

Abb. 19	Darstellung des Anr-Dnr-Regulons mit bekannten und unbekannten Zielgenen im PAO1-Wildtyp (A), die in einer <i>anr</i> -Mutante (B) bzw. <i>dnr</i> -Mutante (C) nicht exprimiert werden.	75
Abb. 20	<i>Weight Matrix</i> der Anr-Bindestelle in <i>P. aeruginosa</i> .	78
Abb. 21	Das differentielle Proteom der anaerob kultivierten <i>P. aeruginosa</i> -Stämme MS1 und DHpa3757.	86
Abb. 22	Schematischer Aufbau des verwendeten Chemostaten.	90
Abb. 23	Anzahl von Genen, eingeteilt in funktionelle Klassen (nach www.pseudomonas.com), die in einer <i>P. aeruginosa</i> Chemostat-Kultur unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert (rote Balken) oder reprimiert (blaue Balken) wurden.	91
Abb. 24	Das Nitratreduktase-Operon aus <i>P. aeruginosa</i> .	100
Abb. 25	Der Nitrit- und NO-Reduktase- <i>Locus</i> aus <i>P. aeruginosa</i> .	101
Abb. 26	Das N ₂ O-Reduktase-Operon aus <i>P. aeruginosa</i> .	101
Abb. 27	Das differentielle Proteom denitrifizierender und mikroaerober <i>P. aeruginosa</i> -Chemostat-Kulturen.	113

TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide.	20
Tab. 2 Salzlösungen für das halb-definierte Medium OS.	24
Tab. 3 Spurenelement-Lösung für das AB-Minimalmedium.	24
Tab. 4 Verwendete Antibiotika mit bakterienabhängigen Endkonzentrationen.	25
Tab. 5 Temperaturprotokoll für die PCR.	27
Tab. 6 Gene des <i>P. aeruginosa</i> -Chromosoms, gegenüber denen keine Sonden auf dem GeneChip verankert sind.	37
Tab. 7 Für die Konstruktion von Reportergenfusionen verwendete Primer mit Länge des PCR-Produktes und der Annealing-Temperatur.	42
Tab. 8 Für die Konstruktion von Reportergenfusionen verwendete Primer mit Länge des PCR-Produktes und der Annealing-Temperatur.	43
Tab. 9 Spannungsverlauf während der isoelektrischen Fokussierung der Proteine.	48
Tab. 10 Nitrat- und Nitritkonzentrationen aerober und anaerober <i>P. aeruginosa</i> -Kulturen.	63
Tab. 11 Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene des Energiemetabolismus unter Angabe der Regulationsstärke und der zugehörigen kodierten Proteine.	65
Tab. 12 Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene, deren Regulation vermutlich eine Reaktion auf den durch anaerobe Induktion aerober <i>P. aeruginosa</i> Zellen verursachten Energiemangel darstellt.	67
Tab. 13 Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene, als Reaktion auf den Sauerstoffmangel.	69
Tab. 14 Angabe von anaerob gegenüber aerob regulierten Genen, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren.	71
Tab. 15 Vergleich der anaeroben Induktion (angegeben in n-fach) von zehn Genen unter Verwendung von β -Galaktosidase-Assays gegenüber Microarrays.	73
Tab. 16 Anr- bzw. Dnr-abhängige Gene, deren Transkription unter anaeroben Bedingungen in der <i>anr</i> -Mutante gegenüber Wildtyp-Zellen deutlich geringer war.	76
Tab. 17 Gene, deren Transkription unter Verwendung einer <i>anr</i> -Mutante gegenüber des <i>P. aeruginosa</i> Wildtyps unter anaeroben Bedingungen induziert waren.	80
Tab. 18 Potentielle Anr-abhängige Gene, deren Transkription in der <i>dnr</i> -Mutante gegenüber der <i>anr</i> -Mutante reprimiert waren, in der <i>anr</i> -Mutante gegenüber dem <i>P. aeruginosa</i> Wildtyp jedoch nicht eindeutig reprimiert waren.	81
Tab. 19 Anaerob induzierte potentielle Regulatorgene mit Angabe vorhandener Domänenstrukturen sowie Ähnlichkeiten zu anderen bakteriellen Regulatoren.	83
Tab. 20 Im Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 regulierte Proteine.	87

- Tab. 21** Gene, deren Promotoren eine potentielle Anr-Bindesequenz aufweisen und deren Expression unter denitrifizierenden und mikroaeroben Bedingungen ähnlich stark war. 93
- Tab. 22** Gene, deren Promotoren eine potentielle Anr-Bindesequenz aufweisen und deren Expression unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert war. 95
- Tab. 23** Gene mit einer potentiellen Anr-Bindesequenz, die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert waren. 96
- Tab. 24** Stärke der Konservierung potentieller Anr-Bindesequenzen, angegeben in Scores, von detektierten, in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikroaeroben (MCh) Chemostat-Kulturen nicht unterschiedlich regulierten Genen gegenüber Genen, die differentiell reguliert waren. Ebenfalls angegeben sind potentielle NarL-Bindestellen (www.prodoric.de). 97
- Tab. 25** Gene, die in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikroaeroben (MCh) *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen induziert waren. 99
- Tab. 26** Mittelwerte der Transkriptsignalintensitäten (S) der *cbb₃*-Oxidase-Gene denitrifizierender (DCh) und mikroaerober (MCh) Chemostat-Kulturen sowie aerob gewachsener *batch*-Kulturen (A BK). Ebenfalls angegeben sind die Transkriptionsinduktionen bzw. -reprimierungen der *cbb₃*-Oxidase-Gene denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostatkulturen (DCh vs. MCh) sowie denitrifizierender bzw. mikroaerober Chemostatkulturen gegenüber aerob gewachsener *batch*-Kulturen (DCh vs. A BK bzw. MCh vs. A BK). 103
- Tab. 27** Transkriptionsinduktionen bzw. -reprimierungen der Argininfermentationsgene denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostatkulturen (DCh vs. MCh), denitrifizierender Chemostatkulturen gegenüber 2h anaerob inkubierter *batch*-Kulturen (DCh vs. D BK) sowie denitrifizierender bzw. mikroaerober Chemostatkulturen gegenüber aerob gewachsener *batch*-Kulturen (DCh vs. A BK bzw. MCh vs. A BK). 104
- Tab. 28** Regulation QS-abhängiger Gene denitrifizierender (DCh) gegenüber mikroaerober (MCh) Chemostat-Kulturen. 106
- Tab. 29** Gene der Typ III Sekretion, die in denitrifizierend gegenüber mikroaerob gewachsenen *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen reprimiert waren. 109
- Tab. 30** Differentielle Regulation von Genen in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikroaeroben (MCh) *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen, die weder dem Energiestoffwechsel, dem QS oder dem Typ III Sekretionssystem zugeordnet werden konnten. 112
- Tab. 31** Darstellung der unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen regulierten Proteine unter Angabe des verantwortlichen Regulators sowie der Stärke der Regulation (DCh vs MCh) unter Verwendung sowohl der Proteomanalyse als auch der Transkriptomanalyse. 114

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, dass vor allem im Boden und in wässrigen Habitaten vorzufinden ist. Seine Klassifizierung als opportunistisches Pathogen beruht auf seiner Fähigkeit immunkomprimierte Personen zu infizieren. Als Wirte kann es außer dem Menschen auch Tiere und Pflanzen nutzen.

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges γ -Proteobakterium mit einem hohen GC-Gehalt von 68 %. Aufgrund seiner polaren Begeißelung besitzt es die Fähigkeit zur Fortbewegung. Die äußere Membran von *P. aeruginosa* besteht wie bei anderen Gram-negativen Bakterien aus Phospholipiden, Proteinen und Lipopolysacchariden (LPS). An seiner Zelloberfläche besitzt *P. aeruginosa* Pili, die der Anheftung an Oberflächen sowie an Wirtszellen, wie z.B. an Lungenepithelzellen, dienen. Des weiteren kann es eine Schleimschicht aus Alginat bilden, die eine wirkungsvolle Barriere gegen das Eindringen von Antibiotika und Zellen des Immunsystems bildet.

Charakteristisch für einige *P. aeruginosa*-Stämme ist die Bildung wasserlöslicher Pigmente, wie z.B. dem grünlich fluoreszierenden Fluoreszein oder dem blau-grünen Phenanzinderivat Pyocyanin, dem der Organismus seinen alten Namen *P. pyocaneus* (Erreger des blau-grünen Eiters) verdankt. Weiteres Merkmal für *P. aeruginosa* ist die Bildung des süßlich-aromatischen Duftstoffes *o*-Aminoacetophenon (Hahn-Falke-Klein, 1994; Palleroni, 1992).

Für die molekularbiologischen Untersuchungen des Organismus gibt es eine Vielzahl an Vektoren, ein effektives Transformationssystem, eine etablierte Transposon-Mutagenese-Methode und eine detaillierte Genomkarte. Darüber hinaus ist das gesamte Chromosom sequenziert und über das Internet zugänglich (www.pseudomonas.com).

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* und Mukoviszidose

Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) ist eine genetisch bedingte Krankheit, die sich vor allem in der Lunge manifestiert. Hierbei sammelt sich Schleim in den Bronchien, der aufgrund seiner erhöhten Viskosität nicht mehr abtransportiert werden kann und so zur Verstopfung der Atemwege und zu fortschreitender Zerstörung von Lungengewebe führt. Daraus resultieren Atemnot, Sauerstoffmangel und Herzmuskelschäden.

Die Cystische Fibrose beruht auf einem Gendefekt im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* CFTR, einem Chlorid-ABC Transporter mit zusätzlichen regulatorischen Funktionen (Bear *et al.*, 1992). CFTR sitzt in der apikalen Membran von Epithelzellen und ist für den Großteil der Sekretion von Chlorid-Ionen verantwortlich. Des weiteren besitzt er inhibitorische Wirkung auf den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC), durch den Natrium-Ionen in die Zelle transportiert werden. Bei der Cystischen Fibrose kommt es in 70 % der Fälle aufgrund einer mutierten Aminosäure zum sofortigen Abbau von CFTR durch das Proteasom (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Dies resultiert in der Deregulation des Na^+ - und Cl^- -Haushalts, die sich in einer erhöhten Salzkonzentration in der Epithelzelle widerspiegelt. Die Zelle reabsorbiert verstärkt Wasser, wodurch sich die Flüssigkeitsschicht um die Ciliahärchen verringert und die Viskosität der Mucusschicht erhöht wird. Diese zähflüssige Mucusschicht, die hauptsächlich aus stark vernetzten, hochglykosylierten Proteinen (Mucinen) besteht, verklebt die Cilialhärchen, wodurch ein Abtransport erschwert bzw. sogar ganz verhindert wird (Abb. 1; Bear *et al.*, 1992; Knowles und Boucher, 2002)

Im Gegensatz zur Situation in der Lunge von gesunden Menschen können die pathogenen Bakterien, Pilze und Viren, die in den Mucus eingedrungen waren, nicht mehr abtransportiert werden, und es kommt zu erhöhten Infektionsraten. Unter den in CF-Lungen identifizierten Keimen befinden sich neben *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Burkholderia cepacia* und *Mycobacterium tuberculosis*, aber auch Pilze wie *Aspergillus fumigatus* sowie Viren (Aebi *et al.*, 2001). Obwohl die Bakterienpopulation, deren Zusammensetzung sich im Infektionsverlauf ändert, aus einer Vielfalt an pathogenen Mikroorganismen besteht, wird das Bakterium *P. aeruginosa* als CF-Leitkeim bezeichnet aufgrund der über 80 %igen Infektionsrate von CF-PatientInnen mit diesem Keim (Hoiby, 1993; Smith *et al.*, 1996).

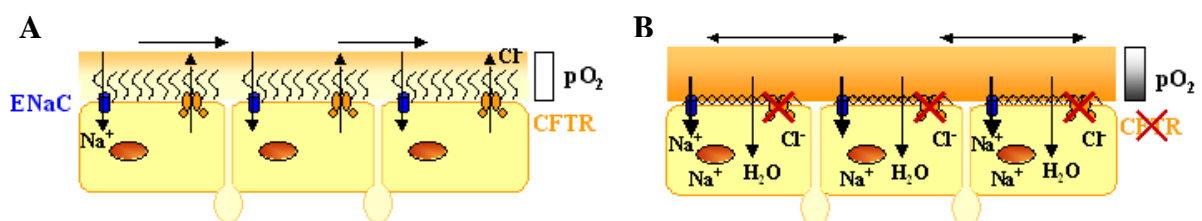


Abb. 1: Schematische Darstellung von Lungenepithelzellen gesunder Menschen (A) gegenüber CF-PatientInnen (B). Eine durch Mutation hervorgerufene Fehlfunktion des Chlorid-Transporters CFTR von CF-PatientInnen führt zur Deregulation des Na^+ - und Cl^- -Haushalts der Lungenepithelzellen. Aufgrund der nun erhöhten Salzkonzentration in der Zelle wird dem Mucus Wasser entzogen, wodurch dessen Viskosität erhöht wird. Dies resultiert in einem verschlechterten Abtransport des Mucus inklusive der darin eingedrungenen Bakterien sowie in einer verschlechterten Sauerstoffdiffusion in die Zellen.

Die Verdickung des Mucus und der erhöhte Sauerstoffverbrauch der CF-Lungenepithelzellen sowie infizierender Mikroorganismen führen innerhalb der Mucusschicht zu einer Ausbildung eines aerob bis anaeroben Sauerstoffgradienten, mit der anaeroben Schicht direkt oberhalb der Epithelzellen. Bei einer Infektion setzt sich *P. aeruginosa* in der unteren, einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck aufweisenden Schleimschicht fest und bildet dort Biofilm-ähnliche Mikrokolonien. Durch die Ausscheidung des Virulenzfaktors Alginat wird die Diffusion von Sauerstoff erschwert, resultierend in einer Verschiebung des Sauerstoffgradienten nach mikroaerob bis anaerob, wodurch die Atmung der PatientInnen weiter erschwert wird (Worlitzsch *et al.*, 2002).

P. aeruginosa nutzt unter diesen Bedingungen entweder geringe Mengen an Sauerstoff zur Atmung, oder die alternativen terminalen Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit. Letztere konnten in Konzentrationen von $383 \pm 42 \mu\text{M}$ an Nitrat bzw. $125 \pm 55 \mu\text{M}$ an Nitrit in CF-Sputum detektiert werden (Knowles & Boucher, 2002; Hassett *et al.*, 2002).

1.1.2 Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa kann Harnwegs-, Atemwegs- und Wundinfektionen als auch Meningitis verursachen. Am Anfang der Infektion steht die Wirtsbesiedelung durch *P. aeruginosa*, die nach Pollack in drei Stufen unterteilt werden kann. Hierbei kommt es zuerst zur Anheftung an die Wirtszelle mit nachfolgender Kolonisation, an die sich eine Infektion auf lokaler Ebene anschließt. Letztendlich kommt es zur Ausbreitung durch den Blutstrom mit darauffolgendem systemischem Krankheitsbild (Pollack, 2000). Wie in Abb. 2 ersichtlich, werden bei einer Infektion eine Vielzahl an Virulenzfaktoren ausgeschieden, darunter Proteasen und Hemolysine, sowie Exotoxin A, Exoenzym S und Pyocyanin (Van Delden und Iglewski, 1998).

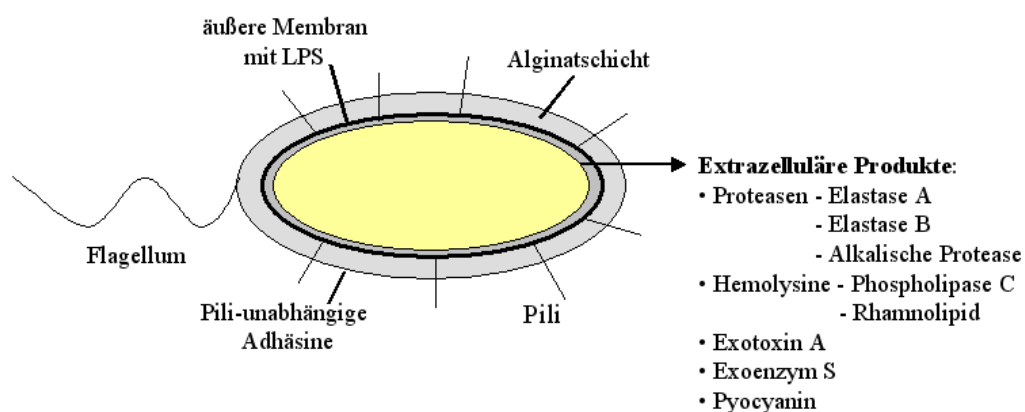


Abb. 2: Schematische Darstellung einer *P. aeruginosa*-Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten und translozierten Virulenzfaktoren.

Eine Behandlung gegen *P. aeruginosa* wird erschwert durch seine natürliche Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika und seine Fähigkeit, neue Resistenzen schnell auszubilden. Ein weiteres Hindernis für eine Antibiotikatherapie bildet die von *P. aeruginosa* bei einer Wirtsbesiedelung ausgebildete Alginatschicht, die das Eindringen der Antibiotika in die Bakterienzelle erschwert.

1.1.2.1 Sekretionssysteme zur Freisetzung von Virulenzfaktoren

Zur Ausscheidung von Proteinen besitzt *P. aeruginosa* eine Vielzahl an Sekretionssystemen, wobei die von diesem Bakterium bei der Infektion freigesetzten Virulenzfaktoren hauptsächlich mittels drei Sekretionssystemen ausgeschieden werden. Dazu gehört das Typ I-Sekretionssystem, das einen ABC-vermittelten Transport zur Sekretion von Proteasen nutzt. Zur Ausscheidung der Virulenzfaktoren Elastase (LasB), Exotoxin A, Alkalische Phosphatase und Phospholipase C benötigt *P. aeruginosa* das Typ II-Sekretionssystem. Dieses System nutzt für den Transport durch die innere Membran entweder das Sec- oder das Tat-System und zur Überwindung der äußeren Membran das Xcp- oder Hxc-System (Filloux *et al.*, 1998). Um seine Virulenzfaktoren Exoenzym S, T, U und Y direkt in die Wirtszelle zu injizieren, nutzt *P. aeruginosa* das unter pathogenen Gram-negativen Bakterien weit verbreitete Typ III-Sekretionssystem (TTSS) (Hueck, 1998). Strukturell ähnelt der Grundkörper des TTSS dem Basalkörper der Flagellen, besitzt jedoch an Stelle des Hakens und des flagellaren Filaments eine Art Injektionsnadel. Am besten untersucht ist dieses Sekretionssystem bei *Yersinia*, bei der die durch die Nadel sekretierten Faktoren LcrV, YopB und YopD die Translokationspore in der Wirtsmembran bilden (Büttner und Bonas, 2002). Für die meisten der am Sekretions- und Translokationsprozess beteiligten Proteine dieses Systems gibt es in *P. aeruginosa* homologe Proteine, wobei für PopB, PopD und PcrV die funktionelle Homologie bestätigt wurde (Abb. 3; Frithz-Lindtsen *et al.*, 1998; Homlström *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 1999).

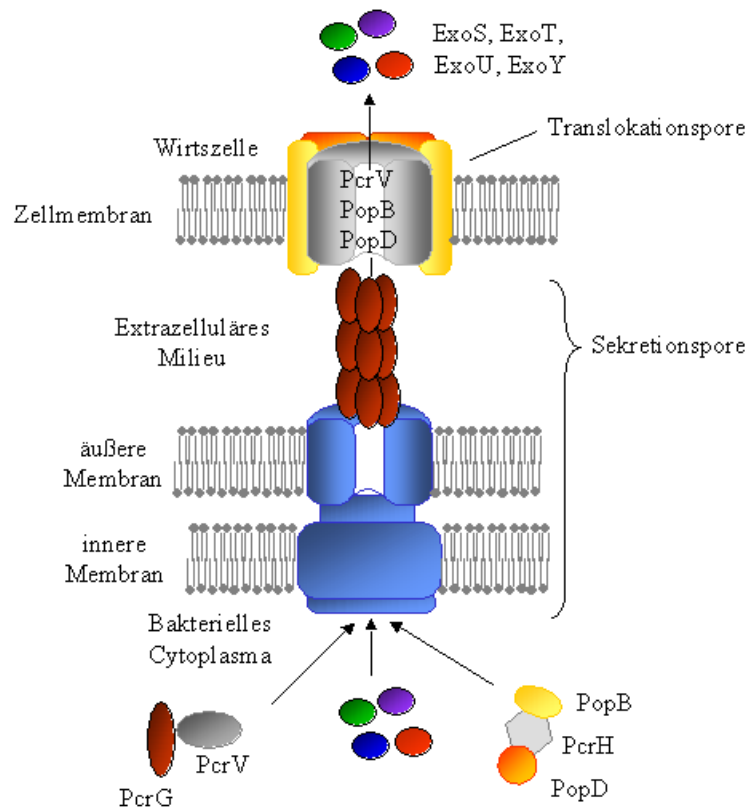


Abb. 3: Schematische Darstellung des Typ III-Sekretionssystems (TSS) aus *P. aeruginosa*. Das TTSS besteht aus einem Basalkörper, der in der inneren und äußeren Membran des Bakteriums verankert ist. Die Verbindung zur Wirtszelle besteht aus einer Nadel-ähnlichen Struktur, an dessen Ende die Translokationspore in die Wirtszell-Membran eingebaut wird. Über diese Pore, die aus den Proteinen PopB, PopD und PcrV gebildet wird, werden die Effektoren ExoS, ExoT, ExoU und ExoY in die Wirtszelle transloziert.

Durch dieses Sekretions-/ Translokationssystem werden sogenannte Effektorproteine ins Cytoplasma der eukaryotischen Wirtszelle transloziert, von denen in *P. aeruginosa* bisher vier bekannt sind. ExoS und ExoT sind bifunktionelle Proteine mit N-terminaler Rho-GAP (*GTPase-activating protein*)-Aktivität und C-terminaler ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität. Die Fähigkeit die Rho-GTPasen Cdc42, Rac und RhoA eukaryotischer Zellen zu inaktivieren, resultiert in einem Umbau des Actin-Cytoskeletts (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2002; Sun und Barbieri, 2004). Als Substrate für die ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität von ExoS dienen in der eukaryotischen Zelle Ras sowie Ras-verwandte Proteine, deren Inaktivierung letztendlich den Zelltod der Wirtszelle zur Folge hat (Ganesan *et al.*, 1999). Für die Aktivität von ExoS ist das Chaperon PA3942, ein Homolog zu SycE aus *Yersinia*, notwendig, dessen genaue Funktion noch nicht geklärt wurde und dessen Gen divergent orientiert in Bezug zu *exoS* liegt.

ExoY ist eine Adenylat-Cyclase, welche erhöhte Konzentrationen an intrazellulärem cAMP in den intoxizierten Zellen hervorruft, resultierend in Veränderungen der Zellmorphologie (Yahr

et al., 1998; Sawa *et al.*, 1999). Der vierte Effektor, ExoU, welcher nur in einigen klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten vorhanden ist, ist eine Phospholipase (Sato *et al.*, 2003), die im Mausmodell durch Schädigung des Lungenepithels eine entscheidende Rolle in Atemwegsinfektionen spielt (Finck-Barbancon *et al.* 1997; Allewelt *et al.*, 2000).

Die Expression der Gene des TTSS ist strikt reguliert. Die exakten Signale zur Induktion der TTSS-Gene sind nicht bekannt, allerdings lösen Kontakt mit eukaryotischen Zellen, Serum sowie Calciumchelatoren die Expression dieser Gene aus (Iglewski *et al.*, 1978; Rosqvist *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1980). Unter diesen Bedingungen wird die koordinierte Transkriptionsaktivierung der Gene der Exoenzyme induziert sowie der fünf Operons *pscNO*, *popNpcr1-4pcrDR*, *pcrGVHpopBD*, *exsCBA* und *exsDpscB-L*, deren Genprodukte Bestandteile des Sekretions- und Translokationssystems bilden. Vermittelt wird diese Transkriptionsaktivierung durch ExsA, einen Regulator der AraC-Familie. Dieser bindet an die Konsensus-Sequenz TNAAANA, deren Entfernung für eine optimale Aktivierung der RNA-Polymerase 51 bzw. 52 bp vom Translationsstart beträgt (Hovey und Frank, 1995; Frank, 1997). Die Regulatoren und der Regulationsmechanismus, durch den Umweltsignale detektiert und mit der ExsA-abhängigen Expression des Typ III-Regulons gekoppelt sind, konnten bisher nicht geklärt werden.

1.1.2.2 Regulation der Bildung einiger Virulenzfaktoren über Quorum Sensing

Zur Kontrolle der Expression von Virulenzfaktoren und der Entwicklung von Biofilmen existiert in *P. aeruginosa* ein Zelldichte-abhängiges interzelluläres Kommunikationssystem, das als Quorum Sensing (QS) bezeichnet wird (Passador *et al.*, 1993). In *P. aeruginosa* existieren zwei QS-Systeme, das Las und das Rhl System. Beide Systeme bestehen aus zwei Proteinen, einem Transkriptionsregulator (LasR bzw. RhlR) und einer Autoinducer-Synthase (LasI bzw. RhlI) (Passador *et al.*, 1993; Ochsner und Reiser, 1995). Diese Enzyme katalysieren die Synthese sogenannter acylierter Homoserinlactone (AHLs), die als kleine, diffundierbare Signalmoleküle agieren. LasI ist verantwortlich für die Bildung von N-(3-Oxododecanoyl)-Homoserinlacton (3-O-C12-HSL) (Pearson *et al.*, 1994) und RhlI synthetisiert den Autoinducer N-Butanoyl-Homoserinlacton (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). Diese AHLs binden an ihren entsprechenden Regulator unter Bildung eines funktionellen transkriptionsregulatorischen Komplexes, welcher die Transkription von ca. 6% der auf dem *P. aeruginosa*-Genom befindlichen *open reading frames* (ORFs) induziert, darunter die Mehrzahl der bekannten Virulenzfaktoren (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003).

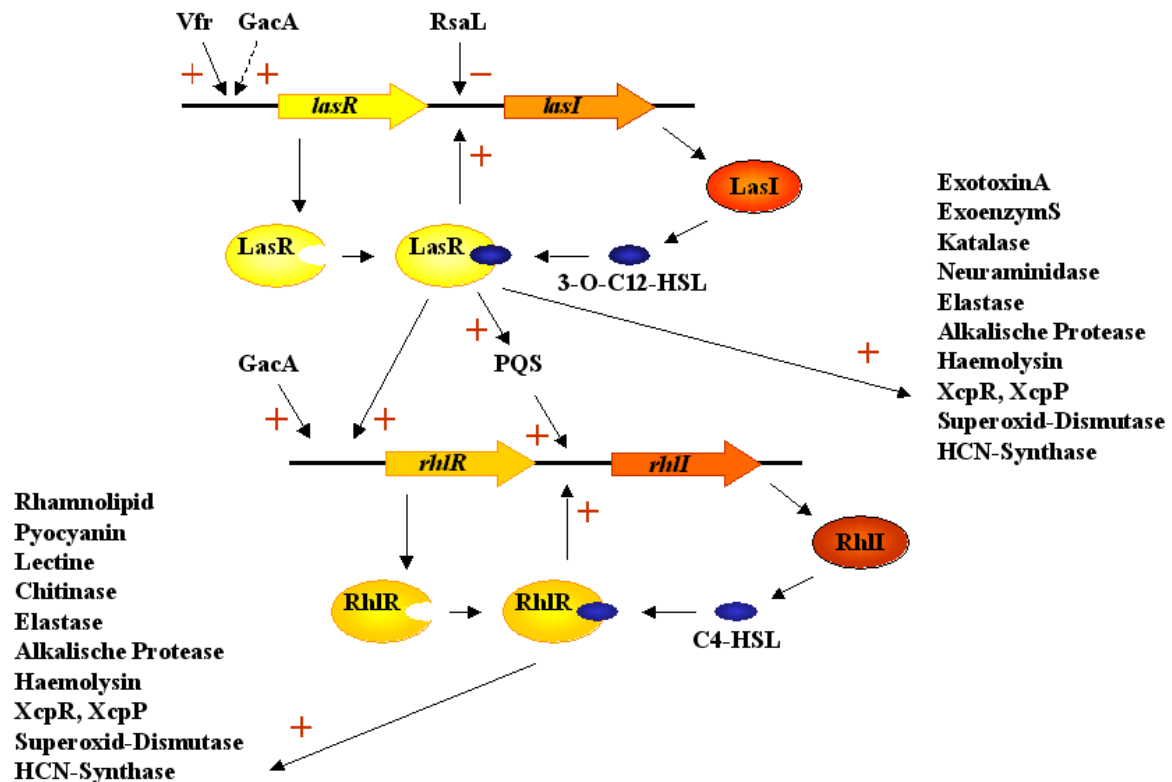


Abb. 4: Schematische Darstellung des Quorum Sensing (QS)-Regulons in *P. aeruginosa*. Das QS-Regulon ist aus dem Las und dem Rhl-System aufgebaut, bestehend aus jeweils einem Transkriptionsregulator (LasR, RhlR) und einer Autoinducer-Synthase (LasI, RhlI). Die durch die Synthesen gebildeten Autoinducer 3-O-C12-HSL (LasI) und C4-HSL (RhlR) bilden mit den zugehörigen Regulatoren transkriptionsregulatorische Einheiten, die ihrerseits die Transkription der angegeben Zielgene induzieren. Die QS-Systeme werden über den Virulenzregulator Vfr sowie GacA, RsaL und das *Pseudomonas* Quinolone-Signalmolekül PQS reguliert.

Die Transkription von *lasR* wird durch die Regulatoren Vfr (Albus *et al.*, 1997) und GacA (Reimann *et al.*, 1997) induziert. Der gebildete Regulator LasR aktiviert mit seinem zugehörigen AHL die Transkription von *lasI* und *rhlR*, wodurch es die beiden QS-Systeme miteinander verbindet (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). Ein Repressor für *lasI* wurde mit RsaL ebenfalls beschrieben (de Kievit *et al.*, 1999). Das *rhl* QS-System wird weiterhin positiv durch GacA (Reimann *et al.*, 1997) und das *Pseudomonas* Quinolone-Signalmolekül (PQS) (McKnight *et al.*, 2000) sowie negativ durch den Transkriptionsregulator MvaT (Diggle *et al.*, 2002) reguliert.

Unter QS-Regulation fallen eine Reihe von Virulenzfaktoren, darunter Elastase, LasA-Protease, Exotoxin A, die HCN-Synthase und Pyocyanin. Darüber hinaus wird die Expression von Genen positiv reguliert, deren Genprodukte der Zelle Schutz vor oxidativem Stress bieten, darunter die Katalase KatA sowie die Superoxid-Dismutase SodA (Abb. 4; Whitehead *et al.*, 2001).

Unter Verwendung eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass dieses interzelluläre Signalsystem *P. aeruginosa* dazu verhilft, die Abwehrmechanismen des Wirtes zu überwinden (Hentzer *et al.*, 2003). Durch eine koordinierte Expression der Virulenzgene einer gesamten Bakterien-Population, sekretiert diese ihre extrazellulären Faktoren erst dann, wenn eine gewisse Zelldichte erreicht wird. Somit werden die Virulenzfaktoren sofort in einer angemessenen Stärke produziert, um die Abwehrmechanismen zu überwinden, die Zellen zu infizieren und sich im Wirtsorganismus auszubreiten.

1.2 Der Energiestoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa besitzt einen effizienten aeroben Stoffwechsel mit einer Generationszeit von ca. 20 min bei 37 °C und ist in der Lage bis zu Temperaturen von 42°C zu wachsen. Als Kohlenstoffquelle kann es eine Vielzahl an organischen Verbindungen nutzen, darunter verschiedene Di- und Tricarbonsäuren, Zucker, Fettsäuren, Alkohole, Polyalkohole, Glycole, aromatische Verbindungen, Amine und Aminosäuren. Glucose wird von Pseudomonaden über den Entner-Doudoroff-Weg verstoffwechselt, wohingegen Enterobakterien den Embden-Meyerhof-Weg bevorzugen. Anstelle von Glucose bevorzugt *P. aeruginosa* jedoch organische Säuren, vor allem Zwischenprodukte des Citratzyklus als Energie- und Kohlenstoffquelle (Palleroni, 1992).

P. aeruginosa ist in der Lage anaerob mittels Denitrifikation zu wachsen, und obwohl Pseudomonaden allgemein die Fähigkeit zur Fermentation abgesprochen wird, kann *P. aeruginosa* zusätzlich Arginin und Pyruvat fermentieren (Lüthi *et al.*, 1986; Eschbach *et al.*, 2004).

1.2.1 Sauerstoffatmung mittels distinkter terminaler Oxidasen

Atmung kann prinzipiell als eine Abfolge von Redoxreaktionen im Sinne der Energiekonservierung in Form eines transmembranen elektrochemischen Protonengradienten verstanden werden. Unter aeroben Bedingungen übernehmen membrangebundene Cytochrom-Oxidasen die terminale Redox-Reaktion, indem sie vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen. In Prokaryonten existieren verschiedene Cytochrom-Oxidasen, die Unterschiede in Bezug auf die Zusammensetzung der Untereinheiten, das verwendete Metall im aktiven Zentrum und der Sauerstoffaffinität aufweisen, die sie befähigen, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen (Pereira *et al.*, 2001).

P. aeruginosa besitzt fünf identifizierte aerobe terminale Oxidasen, von denen die Cyanid-insensitive terminale Oxidase Cio sowie die Cytochrom *o* Ubiquinol-Oxidase Cyo ihre Elektronen direkt aus dem Quinon-Speicher beziehen (Cunningham *et al.*, 1997; Au und Gennis, 1987). Die Cytochrom *c*-Oxidase Cox, eine Oxidase des Typs *aa*₃ sowie zwei Oxidasen des Typs *cbb*₃ erhalten ihre Elektronen über verschiedene Cytochrome *c* bzw. Cupredoxine (Abb. 5) (Comolli und Donohue, 2004).

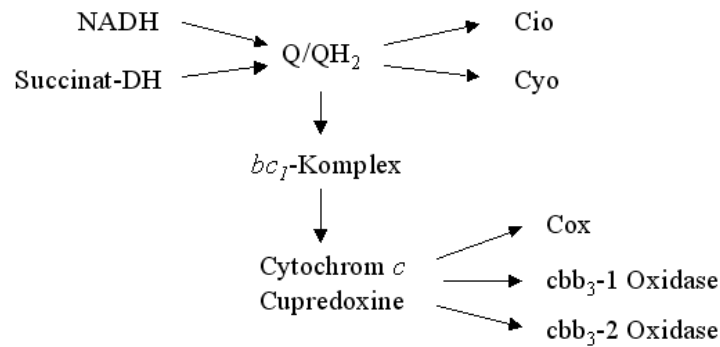


Abb. 5: Schematische Darstellung der aeroben Elektronentransportkette mit den fünf bekannten identifizierten terminalen Oxidasen der aeroben Atmung von *P. aeruginosa*. Die Dehydrogenasen NADH und Succinat-DH reduzieren Quinon (Q/QH₂), das seinerseits die erhaltenen Elektronen an die Cyanid-insensitive terminale Oxidase Cio sowie die Cytochrom *o*-Ubiquinol-Oxidase Cyo abgibt. Des weiteren dient das reduzierte Quinon als Elektronendonator für die Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (*bc*₁-Komplex), die ihrerseits die Elektronen an die terminale Cytochrom *c*-Oxidase Cox sowie die zwei *cbb*₃-Oxidasen abgibt.

Eine Cytochrom Oxidase des Typs *cbb*₃ wurde erstmals als Produkt des Operons *fixNOQP* aus *Bradyrhizobium japonicum* identifiziert, die von diesem Bakterium zur Stickstoff-Fixierung benötigt wird (Preisig *et al.*, 1993). Ähnliche Operons sind seither in vielen nicht diazotrophen Proteobakterien identifiziert und *ccoNOQP* benannt worden (Thöny-Meyer *et al.*, 1994; Pitcher und Watmough, 2004). Die Bildung dieser Oxidasen wird unter mikroaeroben Bedingungen induziert (Preisig *et al.*, 1993; Otten *et al.*, 2001). Um eine ausreichende Energiegewinnung bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck zu gewährleisten, besitzen *cbb*₃-Oxidasen eine hohe Affinität gegenüber Sauerstoff (Preisig *et al.*, 1996). Für die *cbb*₃-Oxidase aus *Pseudomonas stutzeri* wurde zudem eine NO-Reduktase-Aktivität gezeigt (Forte *et al.*, 2001).

P. aeruginosa besitzt zwei Operons, PA1552-1554, kodierend für die Oxidase *cbb*₃-1 und PA1555-1557, kodierend für die Oxidase *cbb*₃-2. Letzteres besitzt in seinem Promotor eine Bindestelle für den globalen anaeroben Regulator Anr und wird im Einklang damit unter mikroaeroben Bedingungen induziert, wohingegen die Oxidase *cbb*₃-1 in aeroben Kulturen verstärkt gebildet wird (Comolli und Donohue, 2004).

1.2.2 Die Denitrifikation

Die Energiegewinnung bei *Pseudomonas aeruginosa* kann sowohl aerob als auch anaerob erfolgen, wobei es unter anaeroben Bedingungen N-Oxide als alternative Elektronenakzeptoren zu Sauerstoff nutzt. Steht *P. aeruginosa* für die anaerobe Atmung

Nitrat zur Verfügung, wird eine vollständige Reduktion zu molekularem Stickstoff durchgeführt, die sogenannte Denitrifikation.



Aufgrund der höheren energetischen Effizienz bei der Nutzung von Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor, werden N-Oxide in vielen Bakterien nur fakultativ genutzt.

Die bei der Denitrifikation ins Periplasma translozierten Protonen dienen durch den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten (PMF, *proton motive force*) und Bildung einer Potentialdifferenz der Energiekonservierung. Die Bildung der benötigten Enzyme wird in der Regel, so auch bei *P. aeruginosa*, durch niedrigen Sauerstoffpartialdruck und die Verfügbarkeit von N-Oxiden induziert.

Der erste Schritt der Denitrifikation ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit mittels dissimilatorischer Nitratreduktasen (Moreno-Vivian *et al.*, 1999). Bisher sind zwei Enzymtypen bekannt, eine periplasmatische (NapAB) und eine cytoplasmatische Nitratreduktase (NarGHI).

Die im Periplasma lokalisierte dissimilatorische Nitratreduktase NapAB leistet im Gegensatz zur cytoplasmatischen Nitratreduktase NarGHI keinen Beitrag zur Protonentranslokation. Eine Hauptaufgabe scheint darin zu bestehen, als nicht protonenpumpende terminale Oxidase das Redoxgleichgewicht zu wahren (Berks *et al.*, 1995; Moreno-Vivian & Ferguson, 1998; Richardson *et al.*, 1988). Indem NapAB auch unter aeroben Bedingungen Nitrat reduziert, werden überschüssige Reduktionsäquivalente abgebaut. Der Elektronentransport bleibt auch in Abwesenheit von Sauerstoff erhalten, wodurch der Übergang zum anaeroben Stoffwechsel erleichtert wird (Siddiqui *et al.*, 1993). Das NapAB aus *Rhodobacter* ist ein Heterodimer, dessen katalytische Untereinheit NapA einen Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) Kofaktor und ein [4Fe-4S]-Zentrum besitzt. Die kleinere Untereinheit NapB besteht aus einem zwei Häm *c* Moleküle enthaltendem Cytochrom *c*, das über das membranverankerte Protein NapC Elektronen aus dem Chinonspeicher bezieht.

Die zweite dissimilatorische Nitratreduktase ist in der Regel ein Heterotrimer (NarGHI) und auf der cytoplasmatischen Seite über die NarI-Untereinheit membranverankert. NarI leitet zudem die benötigten Elektronen über zwei Häm *b*-Gruppen (Ballard & Ferguson, 1988) aus dem Chinonspeicher an NarH weiter und pumpt dabei zwei Protonen ins Periplasma (Berks *et al.*, 1995; Richardson & Watmough, 1999). Über vier Fe-S-Zentren (Augier *et al.*, 1993) werden die Elektronen auf die katalytische Untereinheit NarG übertragen (Guigliarelli *et al.*, 1996), an deren Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktor die eigentliche Reduktion von

Nitrat stattfindet (Frunzke *et al.*, 1993). Das Nitrat-Transportsystem in denitrifizierenden Bakterien konnte noch nicht identifiziert werden, obwohl einige Mechanismen für die Nitrataufnahme vorgeschlagen wurden, wie z.B. passiver Nitratuniport, ATP-abhängiger Uniport, PMF-abhängiger NO_3^-/H^+ -Symport oder $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -Antiport (Berks *et al.*, 1995). Für den Nitrat/Nitrit-Antiport wurde NarK postuliert, das nach Rowe *et al.* jedoch als Nitritexporter ohne Nitrataufnahmefunktion fungiert (Rowe *et al.*, 1994). Ebenfalls diskutiert wird eine Nitrat- und Nitritaufnahme durch das Porin OprF (Hassett *et al.*, 2002).

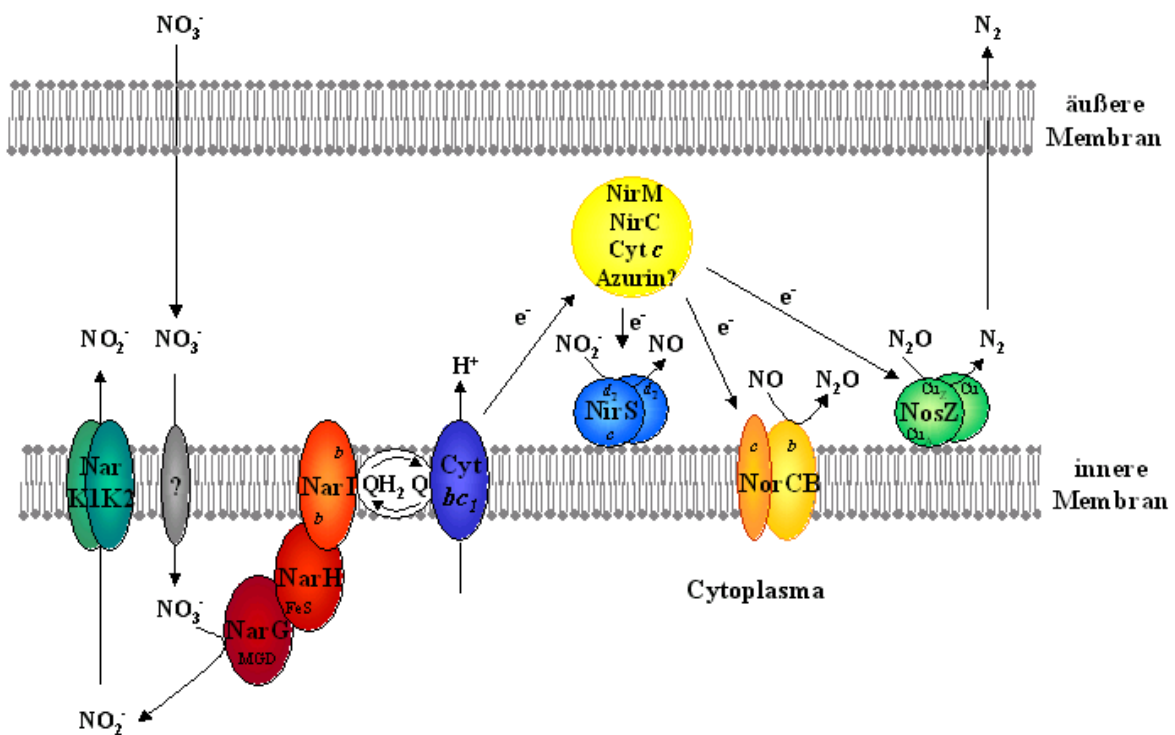


Abb. 6: Schematische Darstellung der Denitrifizierung von *P. aeruginosa*. Nach Aufnahme von Nitrat in die Zelle wird dieses von der membranständigen cytosolischen Nitratreduktase NarGHI zu Nitrit reduziert. Dieses wird mittels NarK1K2 ins Periplasma transportiert, wo es von der Nitritreduktase NirS zu NO umgewandelt wird. Die nachfolgenden Reduktionen von NO zu N_2O mittels der NO-Reduktase NorCB und von N_2O zu N_2 durch die N_2O -Reduktase NosZ finden ebenfalls im periplasmatischen Raum statt, von wo der molekulare Stickstoff durch die äußere Membran ins Medium diffundiert.

Im zweiten Schritt der Denitrifikation wird Nitrit zu Stickstoffmonoxid reduziert. Es gibt zwei Typen von respiratorischen Nitritreduktasen, eine kupferhaltige NirK und eine Häm enthaltende NirS. Beide Enzymvarianten sind im Periplasma lokalisiert, jedoch niemals gemeinsam in einem Organismus. Während NirK Homotrimere mit je einem Kupferatom pro Untereinheit bildet, besteht NirS aus zwei identischen Untereinheiten, die den vier Häm-Moleküle enthaltenden Cytochrom cd_1 -Komplex bilden (Zumft, 1997). NirS, die bisher in 75 % der untersuchten Bakterien vorkommt, so auch in *P. aeruginosa*, erhält ihre Elektronen von dem Cytochrom c_{551} (NirM) (Arai *et al.*, 1990) und dem Cytochrom c NirC (Hasegawa *et*

al., 2001). Eine bisher diskutierte Rolle von Azurin als Elektronendonator für NirS (Canter, 1986; Arvidsson *et al.*, 1989) konnte unter physiologischen Bedingungen nicht bestätigt werden (Vijgenboom *et al.*, 1997).

Aufgrund der hohen Toxizität des freigesetzten NO wird dieses sofort weiter zu N₂O umgesetzt. Gewährleistet wird dies durch die hoch affine Bindung von NO an die membranständige NO-Reduktase NorCB (Braun & Zumft, 1991). Der heterodimere Cytochrom *bc*-Komplex erhält seine Elektronen ebenfalls von Cytochromen im Periplasma. Unklar ist aber bislang, ob die NO-Reduktase auch als Protonenpumpe fungiert, da einige aber nicht alle diesbezüglich relevanten Aminosäuren konserviert sind (Zumft & Körner, 1997).

Die abschließende Reduktion von N₂O zu N₂ erfolgt an der periplasmatisch lokalisierten N₂O-Reduktase NosZ. Die aktive N₂O-Reduktase besteht aus einem Homodimer mit vier Kupferatomen pro Untereinheit. Sie bilden zwei binukleare Zentren, die als Cu_A und Cu_Z bezeichnet und jeweils von zwei Cysteinen verbrückt werden (Kroneck *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 1989).

1.2.3 Energiegewinnung mittels Fermentation

1.2.3.1 Die Argininfermentation

P. aeruginosa kann unter anaeroben Bedingungen, in Abwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren in der Umgebung, Energie durch Fermentation generieren. Hierbei wird zunächst Arginin in Citrullin und Ammoniak mittels der Arginindeiminase ArcA umgesetzt. Citrullin wird darauf unter Einbau von anorganischem Phosphat durch die Ornithin-Carbamoyltransferase ArcB in Carbamoylphosphat und Ornithin umgesetzt. Im letzten Schritt wird Carbamoylphosphat durch die Carbamatkinase ArcC zu Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut, wobei aus ADP ATP gebildet wird (Lüthi *et al.*, 1986). Das entstandene Ornithin wird mittels dem Arginin/Ornithin-Antiporter ArcD aus der Zelle transportiert, wobei im Gegenzug Arginin in die Zelle hineintransportiert wird (Abb. 7; Verhoogt *et al.*, 1992). Ornithin kann demnach nicht als Kohlenstoffquelle dienen, die somit bei Argininfermentationswachstum zusätzlich benötigt wird.

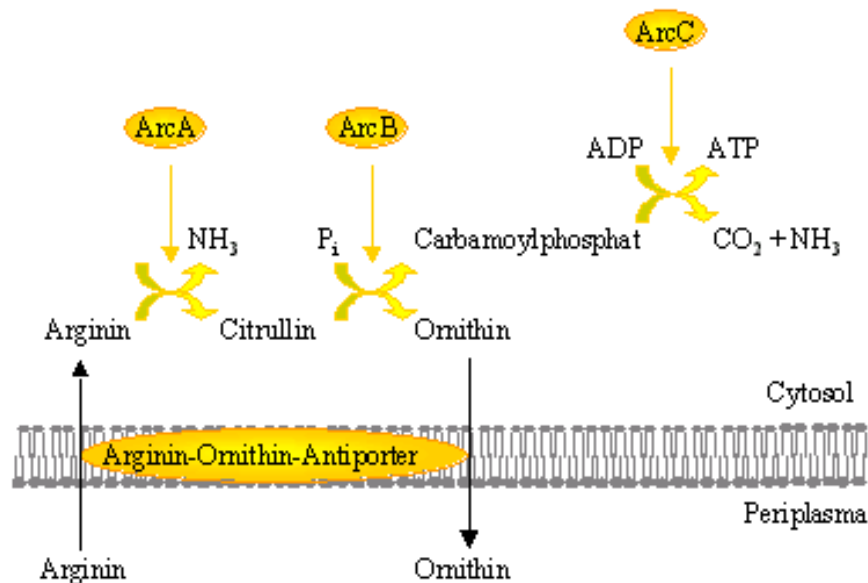


Abb. 7: Schematische Darstellung der Argininfermentation von *P. aeruginosa*. Die Fermentation von Arginin unter Bildung von Ornithin erfolgt über den Arginindeiminase-Abbaupfad, dessen Enzyme durch das *arcDABC*-Operon kodiert werden. Das Arginin wird über den Arginin-Ornithin-Antiporter ArcD in die Zelle transportiert, wo es von der Arginindeiminase ArcA zu Citrullin umgesetzt wird. Der Abbau zu Ornithin erfolgt durch die Carbamatkinase ArcC.

Beim Abbau von Arginin zu Ornithin durch den Arginindeiminase-Abbaupfad wird 1 Mol ATP pro Mol Arginin generiert, somit ist die Argininfermentation die Energiegewinnung mit der niedrigsten Ausbeute. Die Transkription des *arcDABC*-Operons wird durch die Regulatoren Anr und ArgR positiv reguliert und durch Nitrat negativ. Den stärksten Einfluss übt Anr aus, der 42.5 bp vom Transkriptionsstart entfernt an die Anr-Box bindet und durch Kontakt zur RNA-Polymerase diese induziert (Galimand *et al.*, 1991; Gamper *et al.*, 1991). Der Regulator ArgR, der Arginin in der Umgebung detektiert, wird durch Autophosphorylierung befähigt, stromaufwärts in bezug auf den C-terminalen Rest der alpha-Untereinheit der Polymerase an die DNA zu binden (Lu *et al.*, 1999).

1.2.3.2 Die Pyruvatfermentation

In Abwesenheit von Arginin ist *P. aeruginosa* in der Lage durch Pyruvatfermentation bis zu 18 Tage zu überleben, ohne jedoch signifikantes Wachstum aufzuzeigen. Hierbei wird Pyruvat einerseits durch die NADH-abhängige Lactatdehydrogenase LdhA in Lactat umgesetzt. Andererseits setzt *P. aeruginosa* Pyruvat mittels der Pyruvatdehydrogenase Pdh unter Einbau von Coenzym A und Freisetzung von CO₂ in Acetyl-CoA um. Letzteres wird dann durch die Phosphotransacetylase Pta unter Einbau von anorganischem Phosphat in Acetylphosphat und Coenzym A umgebaut. Acetylphosphat wird dann durch die Acetatkinase AckA in Acetat unter Generierung von ATP umgesetzt (Abb. 8) (Eschbach *et al.*, 2004).

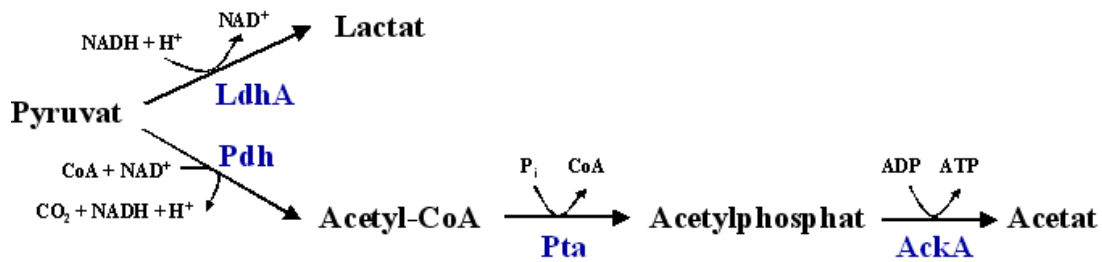


Abb. 8: Schematische Darstellung der Pyruvatfermentation von *P. aeruginosa*. Pyruvat wird zu einem von der NADH-abhängigen Lactatdehydrogenase LdhA in Lactat umgesetzt. Zum anderen erfolgt eine Umsetzung zu Acetat mittels der Pyruvatdehydrogenase Pdh, sowie der Enzyme Phosphotransacetylase Pta und Acetatkinase AckA.

Die anaerobe Transkription des *ackA-pta*-Locus ist Anr-abhängig, wohingegen die Transkription des Gens *ldhA* Anr-unabhängig ist. Weiterhin scheint die Pyruvatfermentation, ähnlich der Argininfermentation, negativ durch Nitrat reguliert, da während der Nitratatmung kein Lactat bzw. Acetat detektiert werden konnte. Die Argininfermentation hingegen scheint von der Pyruvatfermentation unabhängig zu sein (Eschbach *et al.*, 2004).

1.2.4 Die Regulation des anaeroben Energiestoffwechsels

1.2.4.1 Das Nitratsensorsystem NarXL

NarXL ist ein Zweikomponenten-Regulationssystem, dessen membrangebundener Sensor NarX bei Anwesenheit von Nitrat im Lebensraum durch Autophosphorylierung aktiviert wird (Abb. 9). Aktiviertes NarX phosphoryliert daraufhin den eigentlichen Transkriptionsregulator NarL (Walker *et al.*, 1993). Die durch die Phosphorylierung verursachte Konformationsänderung versetzt NarL-P in die Lage, an DNA zu binden. *E. coli* NarL erkennt spezifische Sequenzen im Promotorbereich der Zielgene (TAC^C/_TN^A/_CT, Tyson *et al.*, 1993), an diese es als Monomer bindet. In *E. coli* kommen diese Konsensussequenzen oft als invertierte Wiederholungen vor, die jedoch meist von NarP besetzt werden, einem NarL-Homolog, das in *P. aeruginosa* nicht vorkommt.

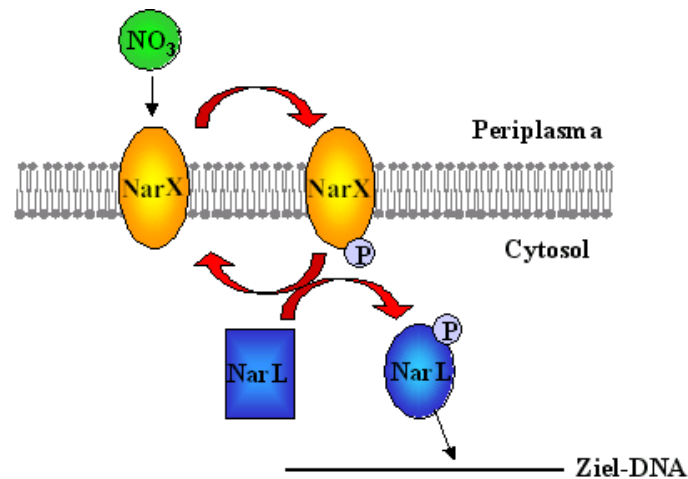


Abb. 9: Mechanismus des NarX/L-Regulationssystems. Nitrat als Signal führt zur Autophosphorylierung des Membranproteins NarX, das dann den Nitratregulator NarL phosphoryliert, wodurch dieser an die entsprechende Ziel-DNA binden kann.

In *E. coli* übernimmt NarX/L die Feinregulation der von Fnr (*fumarate nitrate reduction*), dem globalen Sauerstoff-detektierenden Transkriptionsregulator, unter Sauerstoffmangel induzierten Gene. Einerseits stimuliert NarL bei Anwesenheit von Nitrat die Transkription der Gene der Nitratammunifikation, andererseits schaltet NarL viele anaerobe Funktionen ab, die nicht für die Nitratatmung benötigt werden. So wurde gezeigt, dass die Gene der Fumaratreduktase (Kalman & Gunsalus, 1988+1989), die DMSO/TMAO-Reduktase (Cotter & Gunsalus, 1989), die Formiat-abhängige Nitritreduktase (Hussain *et al.*, 1994), die Alkoholdehydrogenase (Kalman *et al.*, 1988) und die Pyruvat-Formiat-Lyase (Kaiser & Sawers, 1995) reprimiert werden, während die Transkription der Gene der Nitratreduktase, der NADH-abhängigen Nitritreduktase (Spiro & Guest, 1990) und der Formiatdehydrogenase (Darwin & Stewart, 1995) induziert wird.

Für *P. aeruginosa* wurde gezeigt, dass der Regulator NarL unter anaeroben denitrifizierenden Bedingungen eine Aktivierung der Transkription des Operons *narK₁K₂GHJI* bewirkt (Krieger, 2001), dessen Gene sowohl für einen vermutlichen Nitrat-Nitrit-Antiporter kodieren sowie für Untereinheiten der Nitratreduktase. NarL übt des weiteren zusammen mit dem globalen anaeroben Regulator Anr einen positiven Einfluss auf die Expression des Regulatorgens *dnr* aus (Krieger, 2001). Dnr induziert daraufhin die Transkription der an der Denitrifikation beteiligten Gene.

Dieser Regulationsprozess ist sowohl für *E. coli* als auch für *P. aeruginosa* energetisch vorteilhaft, da unter anaeroben Bedingungen die Nitrat-Atmung die Energiestoffwechselform mit der höchsten Ausbeute darstellt (Stewart, 1993).

1.2.4.2 Die Transkriptionsregulatoren Anr und Dnr

Der Redox-Regulator Anr (*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*) ist ein Einkomponenten-Regulationssystem, das sowohl Sensor für den Redoxzustand der Zelle, als auch DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist. Das Protein weist 51 % identische Aminosäuren zum bekannten Fnr (*fumarate nitrate reduction*) aus *E. coli* auf. Das C-terminale *helix-turn-helix*-Motiv ist fast identisch zum *E. coli*-Protein und der N-Terminus enthält die vier konservierten Cysteinreste, die in Fnr an der Bildung des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind. Über die Integrität dieses Fe-S-Zentrums wird der Redoxzustand der Zelle gemessen. Unter oxidierenden Bedingungen wird es über ein [3Fe-4S]- zu einem [2Fe-2S]-Zentrum umgebaut oder ganz zerstört, und das Protein liegt dann als Monomer vor. Fällt der Sauerstoffpartialdruck unter einen Grenzwert, wird das [4Fe-4S]-Zentrum gebildet und Anr geht in seine aktive, DNA-bindende Dimerform über (Sawers, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996). *P. aeruginosa* Anr bindet an eine sogenannten Anr-Box, ähnlich der palindromischen DNA-Sequenz, an die *E. coli* Fnr bindet (TTGAT N₄ ATCAA) (Haas *et al.*, 1992; Winteler & Haas, 1996).

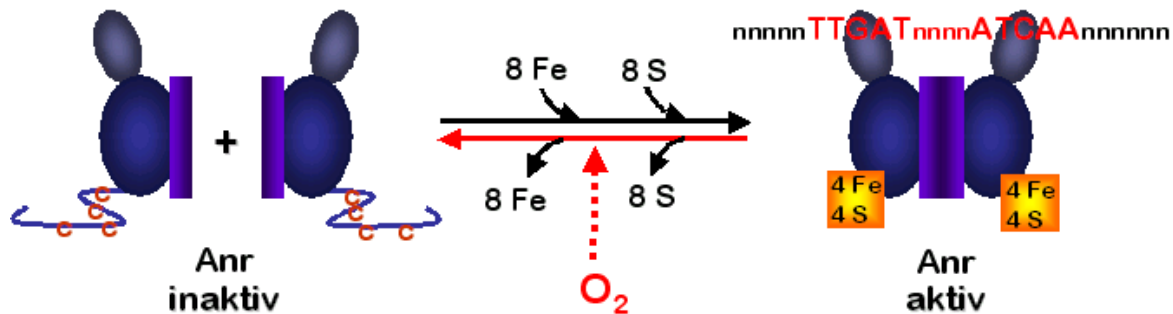


Abb. 10: Schematische Darstellung der inaktiven und aktiven Formen des globalen anaeroben Transkriptionsregulators Anr. Unter Sauerstoffmangel wird ein [4Fe-4S]-Zentrum je Anr-Monomer gebildet und der Regulator geht in seine aktive, DNA-bindende Dimer-Form über.

Während für *E. coli* eine sehr große Zahl Fnr-regulierter Gene bekannt ist, konnten in *P. aeruginosa* bisher nur einzelne Anr-abhängige Gene identifiziert werden. Dazu gehören die Gene des Arginin Deiminase-Operons *arcDABC* (Zannoni, 1989; Galimand *et al.*, 1991), die Denitrifikationsgene (*nar*, *nir*, *nor*, *nos*) (Arai *et al.*, 1994; Arai *et al.*, 1995) sowie die Gene der Cyanogenese (Zimmermann *et al.*, 1991). Des weiteren wird die Transkription der Häm-Biosynthesegene *hemA* (Hungerer *et al.*, 1995; Krieger *et al.*, 2002), *hemF* und *hemN* (Rompf *et al.*, 1998) durch Anr induziert, sowie *azu*, kodierend für Azurin (Vijgenboom, 1997) und die Gene der Cytochrom *c*-Oxidase *cbb3-1* (Comolli und Donohue, 2004). Eine Repression

durch Anr wurde für das Operon *cioAB*, kodierend für die Cyanid-insensitive terminale Oxidase Cio experimentell gezeigt (Cooper *et al.*, 2003).

Arai *et al.* entdeckten 1995 in *P. aeruginosa* einen weiteren Fnr-verwandten Transkriptionsregulator, Dnr (*dissimilatory nitrate respiration regulator*), der auf Aminosäureebene 27 % Identität zu Anr aufweist. Dnr erkennt eine ähnliche DNA-Konsensussequenz wie Fnr und Anr, es fehlen ihm jedoch die konservierten Cysteinreste für die Bildung des Fe-S-Zentrums (Arai *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Denitrifikationsgene (*nirS* und *norC*) über eine Anr-Dnr-Kaskade reguliert werden. Dabei nimmt Anr Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes wahr und aktiviert die Transkription von *dnr*. Dnr wiederum reagiert zusätzlich auf N-Oxide und aktiviert die Transkription der entsprechenden Zielgene (Arai *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2003).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das anaerobe Regulon von *P. aeruginosa* auf Transkriptomebene mit Hilfe des *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) untersucht werden. Hierfür sollte eine vergleichende Transkriptomanalyse aerob und anaerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen durchgeführt werden, sowie von anaerob gewachsenen PAO1 Wildtyp Zellen gegenüber *anr*- und *dnr*-Regulormutanten.

Von Interesse war des weiteren die Aufdeckung und Untersuchung weiterer potentieller anaerober Regulatoren, die einer phänotypischen Charakterisierung mittels Insertionsmutantenstudien unterzogen werden sollten. Diese Mutanten sollten auf ihr anaerobes Wachstumsverhalten auf verschiedenen festen Medien als auch in Flüssigkultur getestet werden. Einen anaeroben Wachstumsphänotyp aufweisende Regulormutanten sollten einer differentiellen Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese unterzogen werden, um Aufschlüsse über das entsprechende Regulon zu bekommen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede im Transkriptom und Proteom von *P. aeruginosa* unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen zu bestimmen. Um einen definierten Sauerstoffpartialdruck sowie konstantes Wachstum der *P. aeruginosa* Zellen zu gewährleisten, sollten für diese Untersuchung Chemostat-Kulturen verwendet werden. Mit den gewonnenen Daten sollte das für die Biofilmbildung und Infektion bedeutende anaerobe Modulon erstmals in seiner Ganzheit beschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Kulturmedienzusätze	Difco (Augsburg)
Molekularbiologische Enzyme	Ambion (Cambridgeshire, UK)
	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
	Boehringer (Mannheim)
	Enzo Life Sciences (New York, USA)
	Invitrogen (Karlsruhe)
	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
Oligonukleotide	MWG (Ebersberg)
	Metabion (Martinsried)
PCR-Produkt Reinigungskits	Qiagen (Hilden)
<i>P. aeruginosa</i> GeneChips	Affymetrix (High Wycombe, UK)
Sterilfilter	Millipore (Eschborn)

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien, Reagenzien und Materialien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Fluka, Merck, Riedel-de-Häen, Roth, Serva oder Sigma.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die in Tab. 1 aufgeführten Bakterienstämme und Plasmide verwendet:

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Beschreibung	Referenz/ Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ 80 Φ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>GibcoBRL</i> (Invitrogen, Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara, leu)$ Karlsruhe) 7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL nupG</i></i>	
SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> (Km ^R)	De Lorenzo & Timmis, 1994
S17 λ -pir	<i>pro thi hsdR⁺ Tp^r Sm^r</i> ; chromosome::RP4-2 Tc::Mu-Km::Tn7/ λ pir	Simon <i>et al.</i> , 1983

Stamm	Beschreibung	Referenz/ Quelle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wildtyp	Dunn & Holloway, 1971
PA6261	PAO1 Δanr	Ye <i>et al.</i> , 1995
RM536	PAO1 <i>dnr::tet</i> , Tc ^R	Arai <i>et al.</i> , 1995
MS1	PAO1 <i>pcs::Gm^R</i>	M. Schobert
DHpa3757	PAO1 PA3757::pEX18Gm	Heldt, 2003
KTpa1	PAO1 PA0120::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa2	PAO1 PA0179::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa3	PAO1 PA2100::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa4	PAO1 PA2834::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa5	PAO1 PA2885::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa6	PAO1 PA3094::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa7	PAO1 PA3341::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa8	PAO1 PA3458::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa9	PAO1 PA3678::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa10	PAO1 PA3973::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa11	PAO1 PA4112::pEX18Gm	Diese Arbeit
KTpa12	PAO1 PA4983::pEX18Gm	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz/ Quelle
mini-CTX- <i>lacZ</i>	Tc ^R ; enthält <i>lacZ</i> -Gen für Reportergenfusionen	Becher & Schweizer, 2000
pEX18Gm	Gm ^R ; <i>oriT⁺ sacB⁺</i> , gene replacement vector	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pKTpa1	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 373 bp-Fragment aus dem Promotorbereich von PA0200, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	Diese Arbeit
pKTpa2	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 625 bp-Fragment aus dem Promotorbereich von PA1557, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	Diese Arbeit
pKTpa3	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 527 bp-Fragment aus dem Promotorbereich von PA1673, in die <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	Diese Arbeit
pKTpa4	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 699 bp-Fragment aus dem Promotorbereich von PA1746, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz/ Quelle
pKTpa5	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 619 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA1789, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa6	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 492 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA3309, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa7	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 319 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA3337, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa8	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 505 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA4067, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa9	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 578 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA5170, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa10	Tc ^R ; mini-CTX- <i>lacZ</i> mit 384 bp-Fragment aus Diese Arbeit dem Promotorbereich von PA5427, in die <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa11	Gm ^R ; pEX18Gm mit 485 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA0120-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>PstI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa12	Gm ^R ; pEX18Gm mit 318 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA0179-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>PstI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa13	Gm ^R ; pEX18Gm mit 802 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA2100-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa14	Gm ^R ; pEX18Gm mit 367 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA2834-Gen, in die <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa15	Gm ^R ; pEX18Gm mit 333 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA2885-Gen, in die <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa16	Gm ^R ; pEX18Gm mit 366 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA3094-Gen, in die <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa17	Gm ^R ; pEX18Gm mit 272 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA3341-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa18	Gm ^R ; pEX18Gm mit 156 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA3458-Gen, in die <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> Restriktionsstellen kloniert	

Plasmid	Beschreibung	Referenz/ Quelle
pKTpa19	Gm ^R ; pEX18Gm mit 498 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA3678-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>PstI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa20	Gm ^R ; pEX18Gm mit 557 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA3973-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa21	Gm ^R ; pEX18Gm mit 416 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA4112-Gen, in die <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> Restriktionsstellen kloniert	
pKTpa22	Gm ^R ; pEX18Gm mit 290 bp-Fragment aus dem Diese Arbeit PA4983-Gen, in die <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> Restriktionsstellen kloniert	

2.3 Medien und Medienzusätze

2.3.1 Komplexmedium

Als Komplexmedium wurde für alle Bakterien LB (Luria Bertani) verwendet.

LB-Medium: 10 g/l Trypton
 5 g/l Hefe-Extrakt
 5 g/l NaCl

Für feste Medien wurden 15 g Agar pro Liter zugesetzt.

Bei der Anzucht von *E. coli* DH10B-Zellen für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde folgendes Medium genutzt:

Superbroth: 32 g/l Trypton
 20 g/l Hefe-Extrakt
 5 g/l NaCl

2.3.2 Halb-definiertes Medium OS

Für Argininfermentationsversuche wurde das halb-definierte Medium OS verwendet. Für die Herstellung von festem OS-Medium wurden 844 ml dH₂O mit 100 ml OSA (Tab. 2) sowie 2.5 g Hefe-Extrakt versetzt und autoklaviert. Daraufhin wurden je 10 ml der sterilfiltrierten Lösungen OSB, OSC und OSD, 1 ml OSE (Lösungen siehe Tab. 2) sowie 25 ml einer 1 M Glucose-Lösung zugesetzt. Der getrennte Ansatz sowie Lagerung der einzelnen Lösungen ist nötig, um die Bildung und das Ausfallen schwer löslicher Salze zu vermeiden.

Tab. 2: Salzlösungen für das halb-definierte Medium OS

OSA	OSB	OSC
35.5 g Na_2HPO_4	59.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
34.0 g KH_2PO_4	500 ml dH_2O	500 ml dH_2O
500 ml dH_2O		
OSD	OSE	
4.40 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.625 g EDTA	0.0513 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0.10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.250 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0975 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.01 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.740 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0292 g H_3BO_3
500 ml dH_2O	0.451 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6 Tropfen HCl_{konz}
	0.325 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	250 ml dH_2O

2.3.3 Minimalmedium

Für definierte Wachstumsbedingungen wurde das Minimalmedium AB verwendet. Zu 100 ml der 10-fach konzentrierten Salzlösung A10 (150 mM Ammoniumsulfat, 335 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 220 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 500 mM Natriumchlorid) wurden 1 ml einer 1 M Magnesiumchlorid-Lösung, 100 μl einer 1 M Calciumchlorid-Lösung, 500 μl einer 50 mM Eisen(II)sulfat-Lösung, 1 ml der Spurenelement-Lösung (Tab. 3), 50 ml einer 1 M Natriumnitrat-Lösung sowie 20 ml einer 1 M Glucose-Lösung zugegeben und mit dH_2O auf 1 l aufgefüllt. Alle Lösungen bis auf die sterilfiltrierten Eisen(II)sulfat- und Spurenelement-Lösungen wurden autoklaviert.

Tab. 3: Spurenelement-Lösung für das AB-Minimalmedium

Spurenelement-Lösung		
200 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
200 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg H_3BO_3
20 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 l dH_2O

2.3.4 Antibiotika

Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen in Wasser bzw. Ethanol angesetzt und sterilfiltriert. Für denitrifizierendes Wachstum wurde den Medien NaNO_3 (Standardendkonzentration 50 mM) zugesetzt. Die Substanzen wurden den autoklavierten, auf RT abgekühlten Medien zugesetzt.

Tab. 4: Verwendete Antibiotika mit bakterienabhängigen Endkonzentrationen

Antibiotika	Stammlösung	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin	50 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml	-
Carbenicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml	500 µg/ml
Chloramphenicol	100 mg/ml in EtOH	34 µg/ml	500 µg/ml
Gentamycin	30 mg/ml in dH ₂ O	10 µg/ml	200 µg/ml (LB) 100 µg/ml (AB)
Tetracyclin	10 mg/ml in 50 % EtOH	5 µg/ml	100 µg/ml

2.4 Mikrobiologische Techniken

2.4.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters war 0.2 µm), Glaswaren wurden für mindestens 3 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

2.4.2 Plattenkulturen von Bakterien

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und auf einer LB-Agar-Platte, bei Bedarf mit entsprechenden Antibiotika versetzt, fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung von Bakterien aus einer Flüssigkeit wurden diese auf LB-Agar-Platten mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.3 Flüssigkulturen von Bakterien

Aerobe Vorkulturen wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte beimpft, bei Bedarf mit Antibiotika versetzt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Aerobe Hauptkulturen wurden mit der Vorkultur beimpft und in Schikanekolben ebenfalls bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt, wobei die maximale Füllhöhe ein Fünftel des angegebenen Kolben-Volumens betrug. Anaerobe Bakterienkulturen wurden mit aeroben Vorkulturen beimpft, in

druckbeständigen Glasflaschen mit Silikongummistopfen verschlossen und bei 37°C und 100 rpm kultiviert. Die Kulturen waren nach ca. 10 Minuten vollständig anaerob.

2.4.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt, wobei davon ausgegangen wurde, dass einer OD_{578nm} von 1.0 ungefähr eine Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml entspricht.

2.4.5 Lagerung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 850 µl einer Bakterien-Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 87 %igem Glycerin gründlich vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die Protokolle der meisten beschriebenen molekularbiologischen Methoden basieren auf Sambrook and Russell (2001).

2.5.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) wurden Genabschnitte und Promotorsequenzen direkt aus dem *Pseudomonas aeruginosa*-Chromosom oder von Plasmiden amplifiziert. Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden etwa 20 ng chromosomale DNA, 10 µl 10 x PCR-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), je 100 pmol Primer, je 2 µl 10 mM dNTPs und 0.5 Units Taq-DNA-Polymerase (Amersham, Freiburg) eingesetzt. Um die Ausbeute an PCR-Produkt zu erhöhen, wurde bei Bedarf entweder 3 % (v/v) DMSO zugegeben und/oder die $MgCl_2$ -Konzentration im Bereich von 2.5 bis 4.5 mM variiert. Die PCR wurde nach dem in Tab. aufgeführten Temperatur-Protokoll in einem PCR-Mini-Cycler (Biozym, Hessisch Oldendorf) durchgeführt.

Tab.5: Temperaturprotokoll für die PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95°C	5 min	Denaturierung der chromosomalen DNA
2	95°C	1 min	Denaturierung der amplifizierten DNA
3	Primer-abhängig	30 sec	Annealing (Anlagerung des Primers)
4	72°C	1 min / 1 kbp DNA	Polymerisation
5		30 Zyklen der Schritte 2-4	
6	72°C	5 min	Vollständige Polymerisation

2.5.2 Restriktion von DNA

Das Schneiden von DNA erfolgte mittels Restriktions-Endonukleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben der Hersteller. Die Inkubationsdauer bei 37°C betrug zwischen 2 und 4 Stunden. Die Ansätze wurden anschließend mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.5.3 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der T4-DNA-Ligase (1 Unit pro 10 µl Ansatz). Zuerst wurde der Vektor mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen geschnitten und anschließend mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 3.5 Units) eineinhalb Stunden bei 37°C dephosphoryliert. Nach 15-minütiger Inaktivierung der SAP bei 65°C wurden die DNA-Fragmente mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte im entsprechenden Ligationspuffer des Herstellers bei einem Stoffmengenverhältnis von 1 (Vektor) : 5 (Insert). Der Ligationsansatz enthielt zwischen 100 ng bis 500 ng DNA und wurde bei 18°C für 24 h inkubiert.

2.5.4 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit Hilfe von 0.7 – 2 %igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.5) aufgetrennt. Der Ladepuffer enthielt 30 µM Bromphenolblau, 450 µM Xylen Cyanol FF, 0.25 % Orange G und 115 mM Saccharose. Als Größenvergleich dienten die DNA-Marker „Gene Ruler 100 bp plus“ und „Gene Ruler DNA ladder mix“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Zur Detektion der DNA

wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 – 20 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und unter UV-Belichtung bei 266 nm dokumentiert. DNA Fragmente von Interesse wurden unter möglichst kurzzeitiger UV-Exposition ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.5.5 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

2.5.5.1 *Escherichia coli*

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* DH10B-Zellen wurden 500 ml Superbroth-Flüssigkultur bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0.6 bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (4300 rpm; 15 min; 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R). Das Bakteriensediment wurde zweimal in 500 ml sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (4300 rpm; 15 min; 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R). Daraufhin wurden die Zellen mit 20 ml 10 %iger (v/v), eiskalter Glycerinlösung gewaschen, wie oben zentrifugiert und anschließend in 1 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder in 125 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Die kompetenten Zellen wurden über Elektroporation mit Hilfe eines Gene PulserTM (BioRad, München) transformiert (Dower *et al.*, 1988). Dazu wurden je 40 µl der *E. coli* Zellen und 0.25-1 µg Plasmid-DNA in eine 2 mm Transformationsküvette überführt und im Gene PulserTM elektroporiert (2.5 kV, 25 µF und 200 Ohm). Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration in 1 ml LB-Medium eine Stunde bei 37°C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Von den Ansätzen wurden 100 bis 200 µl auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Abweichend von obigem Protokoll wurden von dem *E. coli*-Stamm S17-λpir die kompetenten Zellen wie unter 2.5.5.2 für *P. aeruginosa* beschrieben hergestellt. Die kompetenten Zellen von *E. coli* S17-λpir wurden in 1 mm Transformationsküvetten überführt und bei 1.9 kV, 200 Ω und 25 µF elektroporiert.

2.5.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Herstellung kompetenter *P. aeruginosa*-Zellen wurde eine Einzelkolonie auf einer frischen LB-Agar-Platte ausgestrichen und maximal 16 h bei 37°C inkubiert. Von der Platte wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial abgenommen, in 500 µl dH₂O resuspendiert und zentrifugiert (13000 rpm, RT, 1 min, Eppendorf-Tischzentrifuge). Die Zellen wurden ein weiteres Mal in 500 µl dH₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 50 µl dH₂O resuspendiert.

Für die Transformation wurden die kompetenten *P. aeruginosa* Zellen (50 µl) mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt und in 1 mm Elektroporationsküvetten im Gene PulserTM (BioRad, München) elektroporiert (1.9 kV, 25 µF und 200 Ohm). Der Ansatz wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und die Zellen für 1 h im Thermoschüttler bei 37°C regeneriert. Anschließend wurden 10 bis 200 µl Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert.

2.5.6 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Präparationen wurden nach der alkalischen Lyse-Methode (Sambrook *et al.* 2001) durchgeführt. Dazu wurden 4 ml einer Übernachtskultur, deren Zellen das entsprechende Plasmid enthielten, zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, 4°C, Heraeus Biofuge fresco) und in 300 µl Puffer P1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl und 10 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert. Daraufhin wurden 300 µl Puffer P2 (0.2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugegeben, vorsichtig durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P3 (3 M Na-Acetat, pH 5.3) wurde erneut vorsichtig gemischt und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C, Heraeus Biofuge fresco) und zur Ausfällung der Plasmid-DNA der Überstand mit 560 µl Isopropanol vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C, Heraeus Biofuge fresco) wurde die DNA mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl deionisiertem Wasser aufgenommen.

2.5.7 Diparental-Mating zur Transformation von *Pseudomonas aeruginosa*

Für eine effizientere Transformation von *P. aeruginosa* im Gegensatz zur Elektroporation wurde ein Diparental-Mating durchgeführt. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm S17 λ -pir verwendet, der die für die Konjugation eines Vektors benötigten *tra*-Gene besitzt. Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* S17 λ -pir Übernachtskultur, die den gewünschten Vektor enthielt, sowie 500 μ l einer *P. aeruginosa* PAO1 Übernachtskultur für je 1 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge). Die Zellen wurden jeweils in 50 μ l LB resuspendiert, die Suspensionen vereinigt und als Tropfen auf eine LB-Agar-Platte gegeben. Die Zellsuspension wurde für 1 h getrocknet und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium resuspendiert, 200 μ l davon auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C für 24 – 48 h inkubiert. Um das Wachstum des *E. coli* S17 λ -pir Donorstammes zu hemmen, enthielten die Platten zusätzlich 10 μ g/ml Chloramphenicol.

2.5.8 Southern und Northern Blotting

Der Nachweis auf korrekte Insertion der Gentamycin-Resistenzkassette in das *P. aeruginosa*-Chromosom bei der Herstellung von Insertionsmutanten erfolgte mittels Southern Blotting. Der Northern Blot diente als Nachweis für die Anwesenheit von *nirS*- bzw. *arcA*-mRNA unter definierten Wachstumsbedingungen in den für die RNA-Präparation verwendeten Zellen. Alle Behälter, Materialien und Lösungen, die bei der RNA-Präparation und nachfolgenden Northern Blots genutzt wurden, wurden zur Inaktivierung von RNasen 2 x autoklaviert, bei Glaswaren wahlweise mit 1 M NaOH-Lösung gewaschen. Es wurde zusätzlich nur mit Handschuhen gearbeitet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –80°C.

2.5.8.1 Präparation chromosomaler DNA für den Southern Blot

Für die Präparation chromosomaler DNA wurden 4 ml einer Über-Nacht-Kultur für 2 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) und das Sediment in 700 μ l P1 (siehe 2.5.6) resuspendiert. Nach 10 min wurden 700 μ l Phenol/Chloroform zugegeben, gut gemischt und für 15 min zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge fresco). Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und 2 x mit je 700 μ l Phenol/Chloroform gut gemischt und zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min, Heraeus Biofuge fresco). Anschließend wurde die

obere Phase mit 700 µl Chloroform gut gemischt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min, Heraeus Biofuge fresco). Für die Fällung der DNA wurde die obere Phase in 60 µl 3 M Na-Acetat, pH 5.4 und 600 µl Isopropanol versetzt und bei 13000 rpm für 20 min und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco). Die DNA wurde anschließend in 600 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, 10 min bei RT zentrifugiert (13000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge), an der Luft getrocknet und in 100 µl deionisiertem Wasser aufgenommen.

2.5.8.2 Präparation von Gesamt-RNA

Präparation nach Aiba

25 ml Zellen einer OD₅₇₈ von 0.3 wurden auf 25 ml eiskalten Killing-Puffer (20 mM Tris-Cl, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM NaN₃, pH 7.5) gegeben und sofort zentrifugiert (4300 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R). Das Sediment wurde durch mehrmaliges Pipettieren in 200 µl Tris-Cl (500 mM, pH 8.0) gelöst, mit 3 ml Lysis-Puffer (20 mM Na-Acetat, 0.5 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, pH 5.5) versetzt, vorsichtig durchmischt, mit 3 ml 60°C heißem Phenol (equilibriert mit 20 mM Na-Acetat) vorsichtig durchmengt und 5 min bei 60°C inkubiert. Für eine gute Phasentrennung wurde 20 min zentrifugiert (4300 rpm, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R), die obere wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt und mit 1.5 ml heißem Phenol vorsichtig durchmischt. Nach Zugabe von 1.5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und vorsichtigem Durchmengen wurde erneut zentrifugiert (4300 rpm, 4°C, 10 min, Heraeus Megafuge 1.0 R). Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und zur Fällung der RNA mit 9 ml 100 %igem Ethanol versetzt und über Nacht bei –20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (10000 rpm, HB4-Rotor, 4°C, 15 min, Sorvall-Zentrifuge), der Überstand entfernt und das Präzipitat für 10 min an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wurde in 3 ml Lysis-Puffer aufgenommen, mit 9 ml 100 %igem Ethanol versetzt und 1 h bei –20°C gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (10000 rpm, HB4-Rotor, 4°C, 15 min, Sorvall-Zentrifuge) wurde das Präzipitat für 10 min an der Luft getrocknet und in 400 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine erneute Fällung der RNA mit 1 ml 100 %igem Ethanol für 1 h bei –20°C. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min, Heraeus Biofuge fresco) und in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10 min, Heraeus Biofuge fresco) wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 50 µl deionisiertem Wasser gelöst.

Modifizierte Phenol-Extraktion

25 ml Zellen einer OD₅₇₈ von 0.3 wurden auf 25 ml eiskalten Killing-Puffer (20 mM Tris-Cl, 5 mM Mg Cl₂·6H₂O, 20 mM NaN₃, pH 7.5) gegeben und sofort zentrifugiert (4300 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R). Das Zellsediment wurde in 125 µl eiskalter Saccharose-Lösung (300 mM Saccharose, 10 mM Na-Acetat, pH 4.5) aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 125 µl SDS-Lösung (2 % (w/v) SDS, 10 mM Na-Acetat, pH 4.5) wurde die Suspension gut gemischt und für 90 sec bei 65°C inkubiert. Das Gemisch wurde mit 400 µl wässrigem heißem Phenol (65°C) vorsichtig vermengt und für 3 min bei 65°C inkubiert. Nach 30 sec Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde für 10 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), die obere Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und 2 weitere Phenol-Extraktionen vorgenommen. Nachdem die obere Phase ein letztes Mal in ein neues Gefäß überführt wurde, erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe von 40 µl Na-Acetat-Lösung (3M Na-Acetat, pH 4.5) und 1 ml 100 %igem Ethanol bei -20°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 20 min, Heraeus Biofuge fresco), mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, RT, 2 min, Eppendorf-Tischzentrifuge), an der Luft getrocknet und für die weitere Behandlung in 180 µl RNA-Storage Puffer (20 mM Na-Phosphat, pH 6.5, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Um die RNA von eventuellen DNA-Kontaminationen zu reinigen wurden zu den 180 µl RNA in RNA-Storage Puffer 20 µl 10 x DNase Puffer (200 mM Na-Acetat, pH 4.5, 100 mM MgCl₂·6H₂O, 100 mM NaCl) zugegeben, sowie 4 Units DNase I für die weitere Verwendung in Northern Blots bzw. 40 Units für die weitere Verwendung in Microarray-Hybridisierungen und für 30 min bei RT inkubiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

RNA-Präparation unter Verwendung von Trizol

2 ml Kultur wurden für 1 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), das Sediment in 1 ml Trizol stark durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Chloroform zugegeben, gut gemischt und zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min, Heraeus Biofuge fresco). Die obere wässrige Lösung wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, zur Fällung mit 500 µl Isopropanol versetzt, 15 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 30 min, Heraeus Biofuge fresco). Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Präzipitat mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut

zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min, Heraeus Biofuge fresco). Nach Trocknen des Präzipitats an der Luft wurde es in 50 µl deionisiertem Wasser aufgenommen.

2.5.8.3 Bestimmung der DNA bzw. RNA-Konzentration

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch Bestimmung der Extinktion im UV bei 260 und 280 nm, mit deionisiertem Wasser als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde einer DNA-Konzentration von 50 µg/µl gleichgesetzt, bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl.

2.5.8.4 Herstellung der Sonde für den Southern Blot

Die Herstellung der Sonde für die Southern-Hybridisierung erfolgte mittels einer unter 2.5.1 beschriebenen PCR unter Verwendung der DNA-Sequenz der Gentamycin-Resistenzkassette als Templat. Für die Markierung der Sonde wurde Digoxigenin-markiertes dUTP (Dig-dUTP) verwendet, das durch Zugabe von 2 µl des Dig-DNA-Labeling-Mix (Roche, Mannheim) zu der Reaktion in die Sonde eingebaut wurde. Die Anlagerungstemperatur betrug 57°C und das PCR-Produkt besaß eine Länge von 615 bp.

Verwendete Primer waren

Gm-SB-for: 5'-TCC AAG CAG CAA GCG CGT TA-3' und

Gm-SB-rev: 5'-CCG ATC TCG GCT TGA ACG AA-3'.

Um die eventuell bei der Hybridisierung störenden Primer abzutrennen, erfolgte eine Reinigung der Sonde aus einem 1 %igen Agarosegel. Der Test auf die Markierungseffizienz erfolgte durch den Vergleich mit gelabelter DNA (100 ng/µl) der Firma Roche, Mannheim. Sowohl von der mittels PCR gelabelten als auch von der Vergleichs-DNA wurden 6 Verdünnungen von 1:100 bis 1:10.000.000 hergestellt und je 1 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) aufgetragen. Die Vernetzung der DNA mit der Membran erfolgte mittels einem UV-StratalinkerTM 2400 (120 mJ/cm², Stratagene, Heidelberg). Die Detektion der Sonde sowie der Vergleichs-DNA erfolgte analog der Southern/Northern-Hybridisierung, wie unter 2.5.8.7 beschrieben. Für die Hybridisierung wurden 1 µg der Sonde verwendet.

2.5.8.5 Herstellung der Sonden für den Northern Blot

Für die Durchführung der Northern Blots wurden DIG-markierte RNA-Sonden verwendet, die mittels dem DIG-RNA-Labeling-Kit (Roche, Mannheim) synthetisiert wurden. Zuerst erfolgte die Herstellung von Doppelstrang-DNA mittels PCR (siehe Punkt 2.5.1), unter Einbau einer T7 RNA-Polymerase-Bindestelle. Verwendete Primer waren

nirS_NO: 5'-AGT TCA ACG AGG CCA AGC AG-3' und

nirS_T7: 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA-TCG TGC TGG GTG TTG TAG AC-3' für die *nirS*-Sonde, sowie

arcA_NO: 5'-CTG ACC GAG ACC ATC CAG AA-3' und

arcA_T7: 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA-CAG CAG GGT GTT GGT GTA GG-3' für die *arcA*-Sonde.

Die Anlagerungstemperatur für die Herstellung des *nirS*-PCR-Produktes betrug 61°C und das Produkt besaß eine Länge von 1518 bp, wohingegen die Anlagerungstemperatur für die Herstellung des *arcA*-PCR-Produktes 59°C betrug und das Produkt eine Länge von 945 bp besaß. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte aus 1 %igen Agarosegelen.

Für die RNA-Sondenherstellung wurden die Komponenten des DIG-RNA-Labeling-Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Hierzu wurden 13 µl der mittels PCR hergestellten DNA-Matrize, 2 µl 10 x NTP Labeling Mixture, 2 µl 10 x Transcription Buffer, 1 µl (20 Units) RNase Inhibitor und 2 µl (40 Units) T7 RNA Polymerase für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Verdau der DNA erfolgte durch Zusatz von 2 µl (20 Units) DNase I während einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 2 µl einer 200 mM EDTA-Lösung gestoppt. Die Reinigung der RNA-Sonden erfolgte durch Fällung mit 2.2 µl 4 M LiCl und 60 µl 100 %igem Ethanol (-20°C) über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (13000 rpm, RT, 15 min, Eppendorf-Tischzentrifuge), der Überstand abgegossen und die RNA mit 100 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, RT, 5 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand verworfen, die RNA an der Luft getrocknet und in 50 µl deionisiertem Wasser aufgenommen.

Die Messung der Effektivität der Markierungs-Reaktion erfolgte durch Vergleich mit DIG-markierter RNA (10 ng/µl) des DIG-RNA-Labeling-Kits (Roche, Mannheim). Sowohl von der markierten als auch der Vergleichs-RNA wurden 6 Verdünnungen von 1:10 bis 1:1.000.000 hergestellt und je 1 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) aufgetragen. Die Vernetzung der RNA mit der Membran erfolgte mittels einem UV-StratalinkerTM 2400 (120 mJ/cm², Stratagene, Heidelberg). Die Detektion der Sonde

sowie der Vergleichs-RNA erfolgte analog der Southern/Northern-Hybridisierung, wie unter 2.5.8.7 beschrieben. Für die Hybridisierung wurden 100 ng der Sonde eingesetzt.

2.5.8.6 Elektrophoretische Auftrennung und Blotten der DNA bzw. RNA

Für den Southern Blot wurden je 10 µg chromosomale DNA mit je 30 Units der entsprechenden Restriktionsenzyme über Nacht bei 37°C verdaut und am nächsten Tag einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel voneinander getrennt (siehe 2.6.4), 15 min depuriniert (0.25 N HCl), 30 min denaturiert (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl), und anschließend für 30 min neutralisiert (1 M Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5).

Für den Northern Blot wurden je 10 µg RNA mit dH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, mit 10 µl RNA-Probenpuffer (6.5 ml deion. Formamid, 1.2 ml Formaldehyd, 2.0 ml 10 x MOPS-Puffer [200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.0], 400 µl 50 % Sucrose, 20 mg Bromphenolblau und 20 mg Xylencyanol) versetzt, für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels einem 660 mM Formaldehyd-Gel (1 % Agarose für den Nachweis von *nirS*-RNA und 0.8 % Agarose für den Nachweis von *arcA*-RNA) in 4°C kaltem MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7.0) für 4 Stunden bei 100 V und 4°C. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 5 µg/ml Ethidiumbromid in MOPS-Puffer, pH 7.0, gefärbt und über Nacht bei 4°C in dH₂O entfärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel dokumentiert, auf eine Vakuumblotanlage (Biometra, Göttingen) aufgebracht und unter 50 mbar Unterdruck für 5 min mit einer Denaturierungslösung (50 mM NaOH, 10 mM NaCl) überschichtet. Nach Abnahme überschüssiger Denaturierungslösung wurde das Gel für 5 min mit Neutralisierungslösung (100 mM Tris-Cl, pH 7.4) überschichtet und anschließend die überschüssige Lösung abgenommen.

Anschließend wurde die DNA bzw. RNA mittels einer 20 x SSC-Lösung (300 mM Na₃Citrat·2H₂O, 3 M NaCl, pH 7.0) in einer Vakuumblotanlage (Biometra, Göttingen) mit 50 mbar Unterdruck auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNA bzw. RNA durch Bestrahlung mit 120 mJ/cm² in einem UV-StratalinkerTM 2400 (Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.5.8.7 Nukleinsäuren-Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte in Hybridisierungsröhrchen (GM 45, Schott, Mainz) mit Hilfe eines Hybridisierungsofens (Biometra, Göttingen). Zuerst wurde die Membran für 1 h bei 68°C in 20 ml Prähybridisierungs-Lösung (250 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM EDTA, 20 % (w/v) SDS, pH 7.2 und 0.5 % (w/v) Blocking-Reagenz, Roche, Mannheim) inkubiert und anschließend über Nacht bei 68 °C in 20 ml Prähybridisierungs-Lösung, versetzt mit der Digoxigenin-gelabelten Sonde, hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch dreimalige Inkubation für je 20 min bei 68°C mit Waschpuffer (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 7.2) entfernt.

Die Detektion erfolgte bei RT mittels Chemilumineszenz, indem Anti-Dig-Antikörper an die Digoxigenin-markierte Sonde gebunden wurden. Der an diesen Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase wurde als Substrat CDP-Star (Roche, Mannheim) angeboten. Durch die enzymatische Dephosphorylierung zerfiel dieses Substrat, wobei Licht der Wellenlänge 477 nm freigesetzt wurde. Hierfür wurde der Blot für 5 min mit Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 3 M NaCl, 0.3 % (v/v) Tween, pH 8.0) gewaschen und für 1 h mit 0.5 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim) versetztem Maleinsäurepuffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot für 30 min mit 1.5 µl Anti-Dig-Antikörper in Maleinsäurepuffer, versetzt mit 0.5 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim), inkubiert. Der Blot wurde nun 4 x für je 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen und anschließend für 5 min mit Substratpuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9.5) inkubiert. Die Membran wurde aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen, auf eine Folie aufgelegt und mit 15 µl CDP-Star (Roche, Mannheim), verdünnt in 1.5 ml Substratpuffer, benetzt und nach 5 min eingeschweißt. Nach einer Stunde Inkubation unter Lichtausschluss war das Reaktionsmaximum erreicht und das freigesetzte Licht wurde für 10 bis 40 min detektiert. Die Länge der geblotteten Nukleinsäuren wurde mittels einem Digoxigenin-markiertem DNA- bzw. RNA-Längenstandard (Roche, Mannheim) ermittelt.

2.5.9 Transkriptomanalysen mittels *Pseudomonas aeruginosa* GeneChips

Für die Transkriptomanalysen wurde der *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet. Dieser enthält Sonden gegen 5549 der 5570 Protein-kodierenden Gene, einem der vier rRNA-Operons (23S, 16S, 5S rRNA), 18 der 63 tRNA Gene sowie gegen 199 ausgewählte intergenische Regionen des komplett sequenzierten und annotierten Genoms von *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.* 2000). Aufgrund von Genduplikationen im *P. aeruginosa*-Chromosom sind gegen 21 ORFs keine Sonden auf dem Microarray zu finden (Tab. 5).

Tab. 6: Gene des *P. aeruginosa*-Chromosoms, gegen die keine Sonden auf dem GeneChip existieren

Gen	Protein/Funktion	Gen	Protein/ Funktion
PA1512	sekretiertes Protein Hcp	PA3993	hypothetische Transposase
PA1899	Phenanzin-Biosynthese Protein PhzA2	PA4022	hypothetische Aldehyd-Dehydrogenase
PA1900	Phenanzin-Biosynthese Protein PhzB2	PA4212	Phenanzin-Biosynthese Protein PhzC1
PA1937	hypothetisches Protein	PA4213	Phenanzin-Biosynthese Protein PhzD1
PA1938	hypothetisches Protein	PA4214	Phenanzin-Biosynthese Protein PhzE1
PA2040	hypothetische Glutamin-Synthetase	PA4215	hypothetisches Phenanzin-Biosynthese Protein
PA2291	hypothetisches Glucose-sensitives Porin	PA4216	hypothetische Pyridoxamin 5'-Phosphat-Oxidase
PA2319	hypothetische Transposase	PA4277	Elongationsfaktor Tu
PA2463	hypothetisches Protein	PA4797	hypothetische Transposase
PA2690	hypothetische Transposase	PA5267	sekretiertes Protein Hcp
PA3434	hypothetische Transposase		

Weiterhin auf dem GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) enthalten sind Sonden gegen 117 Protein-kodierende Gene weiterer *P. aeruginosa*-Stämme sowie gegen 14 Gene von *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*, wobei letztere als Kontrollen dienen.

Die auf dem GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) enthaltenen Gen-Sequenzen entstammen der Sequenz-Datenbank GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und sind mit weiteren Informationen zum Aufbau des GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) in der Datenbank NETAFFX unter <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx> einsehbar.

Für die Transkriptomanalyse sind auf dem GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) eine variierende Anzahl an 25-mer Oligonukleotid-Sonden entsprechend der Länge der Protein-kodierenden Gene (8-13), tRNA-Gene (8-16) und intergenischen Bereiche (13-122) immobilisiert worden (Lipshutz *et al.* 1999). Jedes Oligonukleotid wird als Sondenzone (*probe cell*) mit Hilfe einer speziellen fotolithographischen Technik auf einer Fläche von 20

$\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ *in situ* synthetisiert (Fodor *et al.* 1991). Hierbei wird neben dem Oligonukleotid, das dem zu analysierenden Sequenzabschnitt komplementär ist (*perfect match oligo*, PM), ein Oligonukleotid mit einer eingefügten Fehlpaarung an Position 13 (*mismatch oligo*, MM) synthetisiert. Beide zusammen bilden ein Sondenpaar (*probe pair*). Die Signalintensität des MM gibt den Hintergrund der spezifischen Hybridisierung an, deren Wert im Laufe der *in silico* Hybridisierungs-Analyse von der Signalintensität des PM abgezogen wird. Alle Sondenpaare, die zusammen einen Sequenzabschnitt auf dem GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) repräsentieren, werden als SONDENSET (*probe set*) bezeichnet. Die Verteilung der Sondenpaare eines SONDENSETS auf dem 1.28 cm x 1.28 cm großen GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) erfolgt statistisch, um die Auswirkungen von uneinheitlichem Hybridisieren und Färben oder mechanischen Schädigungen, wie z.B. Kratzer, auf die Datenerhebung zu minimieren.

2.5.9.1 Aufbereitung der RNA für die GeneChip-Hybridisierung

Die Aufbereitung der RNA für die Hybridisierung der GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Aufgrund von Schwankungen bei der Bakterienanzucht und der RNA-Präparation wurde pro Microarray RNA dreier unabhängiger Kulturen zu gleichen Mengen vereinigt. Die Integrität und spezifische Induktion der Bildung der RNAs von Interesse wurde vorher mit Hilfe von Northern Blots beispielhaft bestimmt (siehe 2.5.8.6 und 2.5.8.7). Alle nachfolgenden Schritte wurden in einem PCR-Mini-Cycler (Biozym, Hessisch Oldendorf) durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Umschreibung der RNA in cDNA. Hierfür wurden pro Microarray 10 μg RNA mit 750 ng Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und mit dH_2O auf 30 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 70°C in einem PCR-Minicycler denaturiert und anschließend zum Anlagern der Primer 10 min bei 25°C inkubiert. Für die cDNA-Synthese wurden dem Ansatz 30 μl cDNA Reaktions-Mix (5 x 1st Strand Buffer, 50 mM DTT, je 1 mM dNTP, 1500 Units der Reversen Transkriptase SuperScript II [Invitrogen, Karlsruhe] und 30 Units des RNase Inhibitors SUPERaseIn [Ambion, Cambridgeshire, UK]) zugegeben und 10 min bei 25°C, anschließend 60 min bei 37°C sowie 60 min bei 42°C inkubiert, und zuletzt 10 min bei 70°C denaturiert. Für die Hydrolyse der RNA wurden 20 μl 1 N NaOH zugegeben und für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Neutralisation mit 20 μl 1 N HCl wurde die cDNA mit Hilfe eines PCR-Reinigungskits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers

aufgereinigt, und durch Messung der UV-Absorption quantifiziert, wobei einer Absorption von 1 bei 260 nm einer cDNA-Konzentration von 33 µg/ml gleichgesetzt wurde.

Um Fragmente von 50-200 bp Länge zu erhalten, wurde die cDNA mit DNaseI verdaut. Die Bestimmung der DNaseI-Konzentration für eine optimale Fragmentierung erfolgte durch Titration des Enzyms gegen die cDNA. Die cDNA wurde daraufhin mit 5 µl 10 x OnePhorAll Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 0.4 bis 0.6 Units DNaseI pro µg cDNA versetzt, mit dH₂O auf ein Volumen von 50 µl gebracht und 20 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Denaturierung bei 98°C für 10 min. Die fragmentierte cDNA konnte bei -20°C gelagert werden. Um die Fragmentgröße zu überprüfen, wurden 10 µl des DNase-Verdaus auf ein 15 %iges TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in 1 x TBE (10 mM EDTA, 445 mM Tris und 445 mM Borsäure, pH 8.3) bei 150 V für 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in 1 x SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) in TBE gefärbt und die fragmentierte cDNA unter UV-Licht detektiert. Als Längenstandard diente Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Zur terminalen Markierung der cDNA-Fragmente mit Biotin-ddUTP wurde das BioArray Terminal Labeling Kit (Enzo, New York, USA) verwendet. Hierfür wurden 39 µl der fragmentierten cDNA mit 12 µl 5 x Reaktions Puffer, 6 µl 10 x CoCl₂-Lösung, 1 µl Biotin-ddUTP und 2 µl Terminaler Desoxynukleotid-Transferase gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 500 mM EDTA, pH 8.0 gestoppt und die markierte cDNA bei -20 °C aufbewahrt. Die Markierungseffizienz wurde mittels einem Neutravidin Gel-Shift Assay überprüft. Hierzu wurden 200 ng der markierten cDNA mit 5 µl 0.4 % (w/v) Neutravidin in 50 mM Tris versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 15 %igen TBE-Polyacrylamid-Gel und Färbung in SYBR Gold wurde die Neutravidin-gebundene cDNA unter UV-Licht detektiert.

2.5.9.2 Auswertung der GeneChip-Hybridisierungen

Die Hybridisierung der GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) mit der gelabelten cDNA sowie das Auslesen der Microarrays mittels dem MAS 5.0 (Microarray Suite 5.0) gesteuerten HP GeneArray Scanner (Affymetrix, High Wycombe, UK) wurde von Tanja Töpfer (Bereich Mucosale Immunität, GBF) unter Nutzung der Affymetrix *Fluidics station* 400 an der GBF, Braunschweig, durchgeführt. Zur Durchführung der Auswertung wurde die MAS 5.0 Software von Affymetrix verwendet.

Um die durch Mengen- und Markierungsunterschiede entstandenen Fehlervarianzen der Transkriptomdaten zu minimieren, wurde eine lineare Normalisierung vorgenommen. Hierbei wurde ein Faktor bestimmt, der durch Multiplikation mit der mittleren Signalintensität eines jeden GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) einen willkürlich gesetzten Eichwert von 25 erreichte. Mit diesem Faktor wurden anschließend alle Signalintensitäten auf dem GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) multipliziert.

Die differentielle Auslesung der PM/MM-Sondensets einer GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) Hybridisierung ermöglichte sowohl eine quantitative Angabe der jeweiligen Signalintensität eines Sondensets als auch eine qualitative Beurteilung der Hybridisierung. Letztere erfolgte über die Angabe des Signifikanzniveaus (*detection p-value*) der Expression. Bei p-Werten < 0.04 galten die Transkripte als anwesend (*present*, P), p-Werte zwischen 0.04 und 0.06 entsprachen einer marginalen Expression (*marginal*, M) und p-Werte > 0.06 wiesen ein Transkript als abwesend (*absent*, A) aus. Sondenpaare, deren Signalintensität sich jenseits der Sättigungsgrenze für den GeneChip (Affymetrix, High Wycombe, UK) befanden, wurden von der Berechnung ausgeschlossen.

Die potentielle Regulation eines Gens wurde durch die qualitative Beurteilung einer differentiellen Genexpression (*change*) und ihres Signifikanzniveaus (*change p-value*) wiedergegeben. Ein Transkript-Vergleich resultierte entweder in einer Induktion (*increased*, I, $p < 0.0025$, *marginal increased*, MI, $0.0025 < p < 0.003$), einer Reprimierung (*decreased*, D, $p > 0.975$, *marginal decreased*, MD, $0.9975 > p > 0.997$), oder wurde als nicht geändert angegeben (*not changed*, NC, $0.003 < p < 0.997$). Die Höhe der differentiellen Expression eines Sondensets auf zwei miteinander verglichenen GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) wurde als Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) transformiertes Signalintensitäts-Verhältnis (*signal log ratio*) angegeben.

Für die differentielle Transkriptomanalyse wurden pro Stamm bzw. Atmungsbedingung je zwei GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) hybridisiert und ausgewertet. Für den Vergleich zweier Zustände standen somit vier Datensets zur Verfügung, die einem Kreuzvergleich unterzogen wurden. Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn sie innerhalb eines Kreuzvergleichs folgende Voraussetzungen erfüllten:

- Das Signifikanzniveau eines induzierten Transkripts war bei beiden GeneChips eines Zustandes als *present* oder *marginal* angegeben.
- Der Mittelwert der Signalintensitäten der induzierten Gene lag über einem Grenzwert von 40 (siehe Kap. 3.1.3).
- Für mindestens 3 von 4 Einzelvergleichen wurde eine signifikante differentielle Expression angegeben (nicht NC).
- Der Mittelwert der Einzelvergleiche betrug ein log₂ transformiertes Signalintensitäts-Verhältnis von 1 (entsprechend einem Signalintensitäts-Verhältnis von 2).

Die finale Auswertung erfolgte unter Verwendung von Excel-Tabellen, wobei für die endgültige tabellarische Darstellung der differentiell regulierten Gene die log₂ transformierten Signalintensitäts-Verhältnisse in lineare Signalintensitäts-Verhältnisse umgerechnet wurden.

2.6 Klonierungsstrategien

2.6.1 Konstruktion von *lacZ*-Reportergenfusionen

Zur Analyse von Promotoren wurden Reportergenfusionen mit dem Gen der *E. coli* β -Galaktosidase und dem gewünschten Promotorbereich hergestellt. Hierzu wurden aus den Promotorbereichen der zu analysierenden Gene mit den in Tab. 6 aufgeführten Primern PCR-Fragmente amplifiziert (siehe 2.5.1). Am 5'-Ende der Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* (for) bzw. *XhoI* (for) für die Konstruktion von pKT3 und *BamHI* (rev) angehängt, mittels der die Amplifikate in den Vektor mini-CTX-*lacZ* ligiert wurden (siehe 2.5.3). Dieser Vektor enthält eine *attP*-Sequenz, mittels der das Plasmid in den chromosomalen *attB*-Locus von *P. aeruginosa* integriert werden kann. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH10B transformiert, kultiviert und die präparierten Plasmide anhand ihrer Restriktionsmuster selektiert (siehe 2.5.6). Die positiven Konstrukte wurden in *E. coli* S17 λ -pir transformiert (siehe 2.5.5.1), von dem die Plasmide mittels Diparental-Mating in *P. aeruginosa* überführt wurden (siehe 2.5.7).

Tab. 7: Für die Konstruktion von Reporterfusionen verwendete Primer mit Länge des PCR-Produktes und der Annealing-Temperatur

Plasmid (Gen)	Primer	Sequenz	Größe Temperatur
pKT1 (PA0200)	200-P_for 200-P_rev	5' -CGG AAT TCG GGT GAT CCA GTC CTG TT-3' 5' -CGG GAT CCT TTC TTG GCC ATG ATC CT-3'	373 bp 51°C
pKT2 (PA1557)	1557-P_for 1557-P_rev	5' -CGG AAT TCG CGG CGT AGA ACG GGT AG-3' 5' -CGG GAT CCT TGG CGG ACC ACC TTG TA-3'	625 bp 55°C / DMSO
pKT3 (PA1673)	1673-P_for(Xho) 1673-P_rev	5' -CCG CTC GAG GGC AAT GAC GGC ATC CA-3' 5' -CGG GAT CCA GAC CAG ATG CGC CAT GA-3'	527 bp 55°C
pKT4 (PA1746)	1746-P_for 1746-P_rev	5' -CGG AAT TCT CAG CGC GCG GCA ACA GG-3' 5' -CGG GAT CCA GGG CCA GGC CGC TGT CG-3'	699 bp 60 °C / DMSO
pKT5 (PA1789)	1789-P_for 1789-P_rev	5' -CGG AAT TCG ATG AAG GCG CCG ACC AC-3' 5' -CGG GAT CCT CAG GGC GAG ACC TTC CA-3'	619 bp 60°C
pKT6 (PA3309)	3309-P_for 3309-P_rev	5' -CGG AAT TCG CCA TGG ACG AGG AAC TG-3' 5' -CGG GAT CCT CCA CGG CTA CCA GAA TG-3'	492 bp 55°C / DMSO
pKT7 (PA3337)	3337-P_for 3337-P_rev	5' -CGG AAT TCA CCT TCG CCG ACG ATC TC-3' 5' -CGG GAT CCT GAT GCT CAT GGG CAC TC-3'	319 bp 55°C
pKT8 (PA4067)	4067-P_for 4067-P_rev	5' -CGG AAT TCG CAC TGG ACG GCA TCG AG-3' 5' -CGG GAT CCG AGG GCC AGC AGG GAA GC-3'	505 bp 55°C / DMSO
pKT9 (PA5170)	5170-P_for 5170-P_rev	5' -CGG AAT TCG AAG CCC AAA TGA AGA GC-3' 5' -CGG GAT CCA CAA CCA GAG CCG TTA GC-3'	578 bp 45°C / DMSO
pKT10 (PA5427)	5427-P_for2 5427-P_rev2	5' -CGG AAT TCG GCG TGG CTT GTA CTG G-3' 5' -CGG GAT CCG GCA GCG GAA CCT TGA C-3'	384 bp 58°C / DMSO

2.6.2 Konstruktion von *Pseudomonas aeruginosa* Insertionsmutanten

Von insgesamt 30 unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten potentiellen Regulatorgenen wurden 12 ausgewählt und von diesen Insertionsmutanten hergestellt. Hierfür wurde der Suicide Vektor pEX18Gm verwendet, der in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar ist und eine Gentamycinresistenzkassette trägt. In Gegenwart des Antibiotikums Gentamycin konnten daher nur *P. aeruginosa*-Klone überleben, die das Plasmid durch einen single-cross-over in ihr Chromosom integrierten.

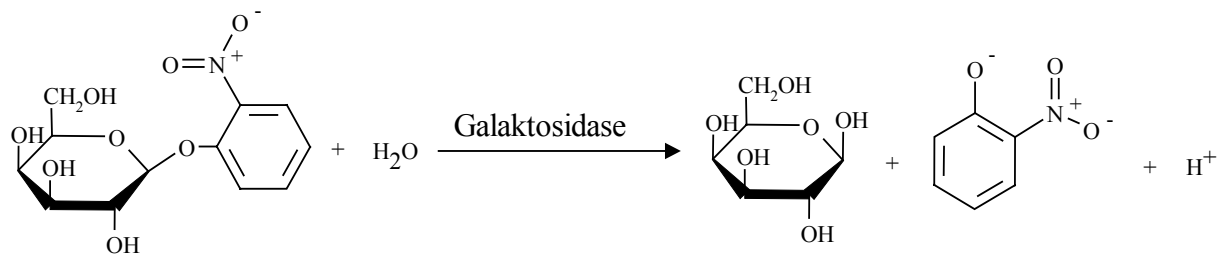
Hierfür wurden aus dem Chromosom von *P. aeruginosa* mittels PCR (siehe 2.5.1) Fragmente aus den entsprechenden Genen mit den in Tabelle aufgeführten Primern amplifiziert. Über angehängte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme am 5'-Ende der Primer (siehe Tab. 7) wurden die Amplifikate in den Vektor pEX18Gm ligiert (siehe 2.5.3). Die über *E.coli* DH10B präparierten Plasmide (siehe 2.5.6) wurden anhand ihrer Restriktionsmuster selektiert. Die positiven Konstrukte wurden in *E. coli* S17λ-pir transformiert (siehe 2.5.5.1), von dem die Plasmide mittels Diparental-Mating in *P. aeruginosa* überführt wurden (siehe 2.5.7).

Tab. 8: Für die Konstruktion der für die Herstellung der Insertionsmutanten benötigten Plasmide verwendete Primer mit Länge des PCR-Produktes und der Annealing-Temperatur

Plasmid (Gen)	Stamm	Primer	Sequenz	Größe Temperatur
pKT11 (PA0120)	PsKT1	120-m-for 120-m-rev	5' -GGT CGC CGT CTA GAT GTT GC-3' 5' -GGA TCT GCA GGG CGT ATT CC-3'	485 bp 59°C/DMSO
pKT12 (PA0179)	PsKT2	179_for 179_rev	5' -CGG CGT CTA TCC TCT AGA TGC T-3' 5' -GCG TCA CTT CCT GCA GTT TC-3'	318 bp 57°C
pKT13 (PA2100)	PsKT3	2100_for 2100_rev	5' -AAC CGC GGT CTA GAA CGT GCT C-3' 5' -GGC TCG CAA GCT TGA GAA CCA G-3'	802 bp 59°C
pKT14 (PA2834)	PsKT4	2834_for 2834_rev	5' -GGA ATT CAA GCT GGA GCG CTG CTT CA-3' 5' -GCT CTA GAC CTG GTC CAG CGG TCC AT-3'	367 bp 58°C
pKT15 (PA2885)	PsKT5	2885_for 2885_rev	5' -GGA ATT CGC GGC AAG CTG CTG CAG AC-3' 5' -GCT CTA GAC GGA CAG CGA GCG CCA CT-3'	333 bp 58°C
pKT16 (PA3094)	PsKT6	3094_for 3094_rev	5' -GGA ATT CAA CGC CTA CAA CCG CTT CG-3' 5' -GCT CTA GAC TCG CGG CCA TTG AGC AT-3'	366 bp 58°C
pKT17 (PA3341)	PsKT7	3341_for 3341_rev	5' -GCT CTA GAC GCG CTG GTT GGT GTT GT-3' 5' -GGA ATT CGC CGG TCA GTA CGT CGT TG-3'	272 bp 57°C/DMSO
pKT18 (PA3458)	PsKT8	3458_for 3458_rev	5' -GGA ATT CAA CTG ACC GCG ACG CAA CT-3' 5' -GCT CTA GAC GAG GTG CAG CCA GGA CT-3'	156 bp 58°C
pKT19 (PA3678)	PsKT9	3678_for 3678_rev	5' -CCA TTC TAG AGG CGG CCA AG-3' 5' -GTT CGG CGC TGC AGA TCA AC-3'	498 bp 57°C/DMSO
pKT20 (PA3973)	PsKT10	3973_for 3973_rev	5' -GCG CAT CCT CTA GAT AGG CCT G-3' 5' -GCA GGC AGA AGC TTA CCA GAG-3'	557 bp 57°C/DMSO
pKT21 (PA4112)	PsKT11	4112_for 4112_rev2	5' -GCT CTA GAT GGA CAT CGC CTC GGA AG-3' 5' -GGA ATT CGA ACG CCA TCT GCC AGT GC-3'	416 bp 57°C/DMSO
pKT22 (PA4983)	PsKT12	4983_for 4983_rev	5' -GGA ATT CGC TGG TGC TGC TGG ACA TC-3' 5' -GCT CTA GAA GTC GCC GAA CTG CCT GA-3'	290 bp 58°C

2.6.3 Der β -Galaktosidase Enzymtest

Für die Bestimmung der Promotoraktivitäten wurden die zu analysierenden Promotorbereiche an das Reportergen *lacZ*, kodierend für die β -Galaktosidase, gentechnisch gekoppelt. Die anschließend bestimmte β -Galaktosidaseaktivität stellte ein Maß für die Transkriptionsstärke der Gene der jeweils getesteten Promotoren dar. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten in *P. aeruginosa* wurde basierend auf dem Verfahren für *E. coli* nach Miller (1992) durchgeführt. Bei diesem Enzymtest wandelt die β -Galaktosidase das Substrat o-Nitrophenyl-galaktosid (oNPG) in o-Nitrophenolat um, dessen Menge photometrisch bei 420 nm bestimmt werden kann:



Die Probenentnahme erfolgte aerob bei einer OD_{578} von 0.3 und anaerob nach 8 bzw. 24 Stunden. Nach der Zentrifugation von 2 ml Kultur wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und die Proben eingefroren. Die Proben wurden in 500 μ l Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 250 μ l mit 750 μ l Wasser in einer Küvette gemischt und die OD_{578} bestimmt. Weitere 250 μ l der Zellsuspension wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0.1 %iger SDS-Lösung versetzt, geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe weiterer 700 μ l Z-Puffer erfolgte der Reaktionsstart durch Hinzufügen von 200 μ l oNPG-Lösung (4 mg/ml, 4°C).

Bei deutlicher Gelbfärbung der Probe, spätestens jedoch nach 30 min, wurde unter Zeitnahme die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Die Proben wurden 2 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) und 900 μ l des Überstands bei 420 nm vermessen. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach folgender Gleichung bestimmt, wobei die eingesetzten Volumina und Verdünnungen in die Formel eingerechnet sind:

$$\text{Aktivität in Miller Units (MU)} = \frac{\Delta E_{420} \cdot 1000}{OD_{578} \cdot V \cdot t} = \frac{\Delta E_{420} \cdot 500}{OD_{578, \text{gemessen}} \cdot t}$$

ΔE_{420}	Extinktionsunterschied des Reaktionsansatzes nach dem Abstoppen der Reaktion zur Ausgangsextinktion
OD_{578}	Optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension
$OD_{578, \text{gemessen}}$	Optische Dichte der 1:4 verdünnten Zellsuspension
V [ml]:	Volumen der eingesetzten Zellsuspension: ursprünglich 0.5 ml. Nach Halbierung des <u>ganzen</u> Reaktionsansatzes nur noch 0.25 ml.
t [min]:	Zeit der Enzymreaktion bis zum Abstoppen (max. 30 min)

2.7 Proteom-Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese können komplexe Proteinmischungen aufgetrennt werden. Bei der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine, in der zweiten Dimension erfolgt die Trennung denaturierend nach der relativen molekularen Masse bzw. nach der Proteingröße. Die Methode wurde bereits 1975 von O'Farrell und Klose unabhängig voneinander entwickelt, gewann aber erst vor ungefähr 10 Jahren sehr stark an Bedeutung (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Einerseits ist die Reproduzierbarkeit der 2D Gele durch die Verwendung immobilisierter pH-Gradienten bei der IEF stark verbessert worden (Görg *et al.*, 1985). Andererseits können die Proteine durch massenspektrometrische Analyse ihrer proteolytischen Spaltprodukte in Kombination mit den verfügbaren komplett sequenzierten Genomen heute sehr schnell identifiziert werden. Durch den Vergleich der gebildeten Proteine unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bzw. unter Verwendung unterschiedlicher Mutanten können Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine gezogen werden bzw. durch einen Regulator beeinflusste Proteine aufgedeckt werden.

2.7.1 Zellernte

Es wurden jeweils drei unabhängige Kulturen parallel untersucht, um zufällige oder durch experimentelle Fehler verursachte Schwankungen und Variationen des Proteinmusters von einer induzierten Änderung der Synthese eines Proteins zu unterscheiden. Die Zellkultivierung erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben. Für die Ernte wurden die Kulturen, um den Zellmetabolismus zum Erliegen zu bringen, bei erreichter OD₅₇₈ sofort mit dem gleichen Volumen an eiskühlem Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7.4) versetzt, und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden zügig bei 4 °C durchgeführt, um Veränderungen der Proteinzusammensetzung während der Präparation zu vermeiden. Die gekühlten Zellen wurden bei 4300 rpm und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R), die Zellsedimente zweimal mit 50 ml eiskaltem Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen und in 3 - 5 ml Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 1 ml Aliquots bei -80 °C gelagert. Von diesen wurden je 60 µl für die BCA-Proteinbestimmung entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels dem BCA-Test

Um die Proteinkonzentration einer Bakteriensuspension mit Hilfe des BCA-Tests zu bestimmen, wurde zunächst eine Eichgerade unter Verwendung von BSA erstellt.

Für den alkalischen Aufschluss der Zellen wurden je 60 µl der Bakteriensuspensionen, der Eichlösungen und dem Kalium-Phosphat-Puffer mit 300 µl dH₂O verdünnt und mit 150 µl einer 2 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die Suspensionen wurden anschließend 1 Stunde bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Für den Test wurden je 50 µl der Ansätze mit 1 ml der Färbelösung (Bicinchoninic acid solution und Copper (II) sulfate solution [Sigma, München] im Verhältnis 50:1) gemischt und bei 65 °C für 15 min inkubiert. Die Ansätze wurden schnell auf RT abgekühlt die Extinktion bei 562 nm gegen die Pufferprobe vermessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben konnte mit Hilfe der Eichgeraden bestimmt werden, wovon je 50 µl für den BCA-Test eingesetzt wurden. 50 µl der Probe wurden mit 1 ml Nachweislösung versetzt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Gemischs auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 562 nm gegen die Pufferprobe gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben konnten mit Hilfe der Eichgeraden bestimmt werden.

2.7.3 Zellaufschluss und Proteinfällung

Für die Zelllyse wurden die geernteten und bei –80 °C gelagerten Zellen schnell aufgetaut und in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 ml eiskalter Kalium-Phosphat-Puffer sowie 2 ml Phenol (pH 7.4) zugegeben und für 2 min intensiv geschüttelt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 70°C im Wasserbad und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert (4300 rpm, 4 °C; 15 min, Heraeus Megafuge 1.0 R). Dabei sammelten sich die Nukleinsäuren und Polysaccharide in der wässrigen Phase, während die denaturierten Proteine eine Grenzschicht zwischen wässriger Phase und Phenol-Phase bildeten. Die obere wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation abgenommen und verworfen. Anschließend folgten zwei Waschschrte, indem jeweils 2 ml dH₂O zu der Phenolphase gegeben und 2 min intensiv geschüttelt wurden. Die Ansätze wurden zuerst für 10 min bei 70°C und danach für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (4300 rpm, 4°C, 15 min, Heraeus Megafuge 1.0 R) wurde die obere Phase erneut verworfen.

Zur Fällung der Proteine nach dem Zellaufschluss wurden 4 ml eiskaltes Aceton zu der Phenolphase gegeben und für 10 min auf Eis unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die

Proteine wurden durch Zentrifugation bei 4300 rpm und 4°C für 15 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 6 ml Aceton resuspendiert. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 4300 rpm und 4°C, wurde der Überstand verworfen, das Proteinsediment an der Luft getrocknet und anschließend bei –80°C gelagert.

2.7.4 Proteinbestimmung mit dem PlusOne 2D Quant Kit

Für die weitere Analyse wurden die Proteine in Rehydratisierungslösung A (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS und 50 mM DTT) aufgenommen, und die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Tests auf 4 mg/ml eingestellt. Die genaue Konzentration der Proteinproben wurde vor der isoelektrischen Fokussierung mit dem PlusOne 2D Quant Kit (Amersham, Freiburg) bestimmt. Hierfür wurde das Protokoll des Herstellers befolgt, wobei für die Eichgerade nur die Werte für 0, 20 und 40 µg BSA ermittelt wurden. Nach dem Test wurde eine 500 µg Protein entsprechende Menge entnommen und mit Rehydratisierungslösung A auf 200 µl aufgefüllt, so dass man eine Konzentration von 2.5 mg/ml erhielt.

2.7.5 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten (IPG)

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 200 µl der Proteinlösung (2.5 mg/ml) mit 100 µl Rehydratisierungspuffer B (2.625 µl Rehydratisierungslösung A, 125 µl Ampholytlösung pH 3-10 und eine Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt und in die Quellkammer gefüllt. Anschließend wurde der pH-Gradientenstreifen (Ready Strip™ IPG Strips, 17 cm, pH 5–8, BioRad, München) mit dem Gel nach unten Luftblasen-frei eingelegt und über Nacht inkubiert, währenddessen die Proteine in das Gel aufgenommen wurden. Um eine Austrocknung bzw. Auskristallisierung des Harnstoffs während der Quellung zu vermeiden, wurde nach der ersten Stunde der Streifen mit 3 ml Mineralöl überschichtet.

Nach der Rehydratisierung der IEF-Streifen in der Proteinlösung erfolgte die Fokussierung in der IEF-Kammer (PROTEAN IEF-Cell, BioRad, München). Für eine bessere Spannungsübertragung wurden die Drähte in der IEF-Kammer mit dH₂O befeuchteten Papierstücken (Elektrode Strip, BioRad, München) bedeckt, der pH-Gradientenstreifen mit der Gelseite nach unten in die Kammer gelegt und mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Es wurde das in Tab. 8 aufgeführte Programm verwendet, wobei die maximale Stromstärke pro Streifen 50 µA betrug. Nach mindestens 110 kVh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die

Gelstreifen wurden, falls sie nicht sofort weiterverarbeitet wurden, in Klarsichthüllen bei -80°C eingefroren.

Tab. 9: Spannungsverlauf während der isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Spannung	Zeit	Übergang
1	250 V	1 h	rapid
2	500 V	1 h	rapid
3	1000 V	1 h	rapid
4	5000 V	22 h	rapid
5	500 V	99 h	rapid

2.7.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nachdem die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt worden waren, erfolgte die Auftrennung in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht. Aufgrund der unterschiedlichen Puffersysteme der beiden Dimensionen wurden die IPG-Streifen vor der Durchführung der zweiten Dimension auf das Puffersystem der Tris-Glycin-SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate – Polyacrylamide gelelectrophoresis) eingestellt. Hierfür wurden die pH-Gradientenstreifen zunächst in je 5 ml SDS-Equilibrierungspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 6 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS, 35 % (v/v) Glycerin und eine Spatelspitze Bromphenolblau), versetzt mit 15 mM DTT leicht schüttelnd für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in SDS-Equilibrierungspuffer, versetzt mit 150 mM Iodacetamid, zur Blockierung der Cysteine.

Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 10 %igen Polyacrylamid-Gelen (26 x 20 cm). Zur Herstellung von 14 Gelen wurden 400 ml einer Acrylamid-Stammlösung (29 % (w/v) Acrylamid und 1 % (w/v) $\text{N,N}'$ -Methylenbisacrylamid) mit 300 ml einer 1.5 M Tris-HCl-Lösung (pH 8.8), 480 ml dH_2O und 10 ml einer 10 %igen (w/v) SDS-Lösung gemischt und kurz vor dem Gießvorgang mit 1 ml TEMED und 3 ml einer 10 %igen (w/v) Ammonium-Persulfat-(APS)-Lösung versetzt. Nachdem die Gellösung von unten in die Gelapparatur gefüllt wurde, wurden 200 ml einer Displacing Solution (375 mM Tris-Cl, pH 8.8, 50 % (v/v) Glycerin und eine Spatelspitze Bromphenolblau) zugegeben, um eine Polymerisierung des Gels im Schlauch zu verhindern. Anschließend wurden die Kämme eingefügt und die Gele in der mit Folie abgedeckten Kammer über Nacht polymerisiert. Die

Gele wurden bis zum Gebrauch in feuchter Atmosphäre bei 4°C zwischen den Glasplatten gelagert.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden zunächst die pH-Gradientenstreifen luftblasenfrei auf die Geloberkante gelegt und mit Sealing Solution (125 mg Agarose und 1 Spatelspitze Bromphenolblau in 25 ml SDS-Elektrophoresepuffer gelöst) fixiert. Daraufhin wurden die Gele in die vertikale Ettan DALT *twelve* System (Amersham Pharmacia, Freiburg) eingebracht. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer (380 mM Glycin, 50 mM Tris und 0.1 % (w/v) SDS) über Nacht bei 20°C und 1 W pro Gel. Erreichte die Bromphenollaufront am nächsten Tag die Unterseite der Gele, wurde die Elektrophorese beendet.

2.7.7 Fixierung und Färbung der Gele

Für die Detektion der Proteine wurden diese mit Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS) angefärbt, das von Dr. Martin Eschbach in unserer Arbeitsgruppe nach der Vorschrift von Rabilloud *et al.* (2001) synthetisiert wurde. Die detektierbare Sensitivität dieses Fluoreszenz-Farbstoffes liegt bei etwa 5 - 10 ng Protein und liegt somit zwischen der Sensitivität von Coomassie Brilliant Blue- und Silberfärbung. Zunächst wurden die Proteine für 2 h in 250 ml Fixierlösung (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) pro 2 Gelen vorfixiert, anschließend in 500 ml frischer Fixierlösung über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit 250 ml frischer Fixierlösung nachfixiert. Die Färbung erfolgte in 500 ml RuBPS-Färbelösung (800 nM Ruthenium-Chelat in Fixierlösung) über einen Zeitraum von 6 h. Vor dem Scannen im Laser-Scanner (Molecular Imager FX der Firma Bio-Rad, München) wurden die Gele 10 min in dH₂O gewaschen. Die Aufnahme erfolgte mit einer Auflösung von 100 µm unter Anregung von 532 nm durch den Laser.

2.7.8 Auswertung der zweidimensionalen Gele

Die Gele wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Z3 (Version 3.0, Compugen, Tel Aviv, Israel) entsprechend des Handbuchs der Software ausgewertet. Nach der Detektion der Proteine wurden „Raw Master Gels“ der beiden zu vergleichenden Zustände erstellt und diese miteinander verglichen. Eine Änderung der Proteinintensität wurde dann als signifikant angenommen, wenn die Induktion oder Reprimierung von dessen Produktion einen Wert von ± 2 über- bzw. unterschritt.

2.7.9 Vorbereitung der zu analysierenden Proteine für die Massenspektrometrie

Die mittels der Z3-Software ermittelten Proteine wurden unter UV-Licht aus der Gelmatrix ausgestochen und für die Identifizierung im Massenspektrometer vorbereitet. Bei der Durchführung aller folgenden Schritte wurde stets mit in Wasser gewaschenen Handschuhen gearbeitet, um eine Kontamination der Proben durch Keratin oder PEG zu vermeiden. Letzteres ist in Handschuhen enthalten und stört die massenspektrometrische Analyse. Zunächst wurden die die Proteine enthaltenden Gelstücke 10 min in 200 µl dH₂O gewaschen. Nach Entfernung des Überstands wurden die Gelstücke in je 20 µl Acetonitril für 10 min bei RT inkubiert, wodurch das Gel dehydratisiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke in einer SpeedVac unter Vakuum getrocknet.

Für den folgenden tryptischen Verdau wurden die Gelstücke in 10 µl Trypsinlösung (2 ng/µl in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung) rehydriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide aus dem Gel wurden zunächst 15 µl einer 25 mM NH₄HCO₃-Lösung zugegeben und für 15 min bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Acetonitril wurden die Gelstücke innerhalb von 15 min dehydratisiert. Der Überstand mit den enthaltenen Peptiden wurde entfernt und in ein neues Gefäß überführt. Zu den Gelstücken wurden nun 45 µl 5 % Ameisensäure gegeben und die Ansätze für 15 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 45 µl Acetonitril wurden die Gelstücke erneut für 15 min dehydratisiert, die Überstände vereinigt und in der SpeedVac bis auf ein Volumen von 10 – 15 µl eingeeengt.

Die gewonnenen Peptidlösungen wurden mit ZipTip µC18 der Firma Millipore, Eschborn, entsalzt und konzentriert. Hierbei handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem „*reversed phase*“ C-18 Chromatographiematerial geringen Volumens, an welches Peptide gebunden, gewaschen und anschließend in einem sehr kleinen Volumen wieder eluiert werden können. Die ZipTips (Millipore, Eschborn) wurden zunächst durch mehrmaliges Pipettieren einer Lösung von 0.5 % Ameisensäure und 65 % Methanol gewaschen und anschließend durch Pipettieren von 0.5 % Ameisensäure und 5 % Methanol äquilibriert. Danach erfolgte das Binden der Peptide am Trägermaterial durch zehnmaliges langsames Pipettieren der Probe, gefolgt von der Reinigung der Peptide durch fünfmaliges Pipettieren in 10 µl frischer Waschlösung (0.5 % Ameisensäure und 5 % Methanol). Anschließend wurden die gereinigten Peptide durch einmaliges Pipettieren von 0.5 µl Elutionslösung (0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) direkt auf das MALDI-Target aufgetragen. Zu dem Eluat wurden 0.5 µl matrixgesättigte Elutionslösung (α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 0.5% Ameisensäure und 65% Methanol) pipettiert, vermengt und getrocknet.

Alle weiteren Arbeitsschritte der MALDI-Analyse wurden im Labor von Dr. Lothar Jänsch an der GBF (Braunschweig) von Jaqueline Majewski und Dr. Matthias Trost durchgeführt.

2.7.10 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Für die Proteinidentifizierung mittels der MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) Massenspektrometrie (Abb. 11), wurde das Probenmaterial in die organische, aromatische Säure α -cyano-Hydroxyzimtsäure unter Zugabe von Ameisensäure eingebettet. Ein wenige Nanosekunden kurz gepulster Laserstrahl wurde auf die Matrix gerichtet, wodurch an dieser Stelle eine explosionsartige Verdampfung von Matrix und Probe stattfand. In der energiereichen Gaswolke wurden die Peptide durch Protonentransfer der Säuremoleküle ionisiert. Anschließend wurden die ionisierten Peptide durch ein angelegtes elektrisches Feld beschleunigt, bis sie in eine feldfreie Region des Massenspektrometers (Flugrohr) gelangten. Aufgrund der Beschleunigung der fast ausschließlich einfach-geladenen Peptidionen durch das gleiche elektrische Feld, besaßen die Peptide im Flugrohr alle die gleiche kinetische Energie, aufgrund ihrer jeweiligen Masse jedoch unterschiedliche Geschwindigkeiten. Die Trennung der Peptide erfolgte nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), wobei die Massenbestimmung durch die Bestimmung der Zeit erfolgte, die die Ionen nach der Ionisierung zum Durchqueren des Flugrohrs benötigten.

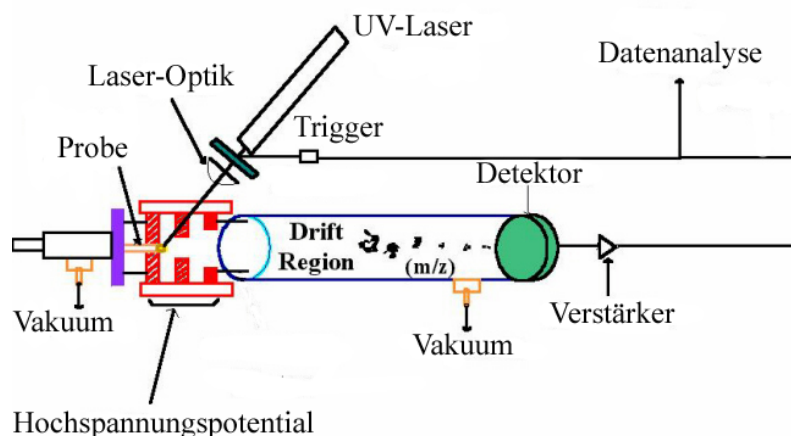


Abb.: 11 Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers. Die zu analysierenden Peptide sind in eine organische Matrix eingebettet und werden mittels einem gepulsten Laserstrahl verdampft. In der Gasphase werden die Peptide protoniert und durch ein angelegtes Spannungspotential beschleunigt, bis sie in eine feldfreie Drift-Region kommen, in der sich die Peptide nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis auftrennen. Mittels der Zeit, die die Peptide zum Durchqueren des Flugrohrs benötigen, wird die Masse berechnet.

Für die Proteinidentifikation mittels MALDI TOF MS wurde das Peptidmassenfingerabdruck-Verfahren (Peptide Mass Fingerprint, PMF) verwendet. Hierfür wurden die Massen der nach der spezifischen Spaltung durch Trypsin erhaltenen Peptide des zu analysierenden Proteins gemessen. Durch einen Vergleich mit einem theoretischen Verdau aller Proteine des Genoms konnte das entsprechende Protein identifiziert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Das anaerobe Regulon von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Humanpathogen, das sich verschiedenen Umweltbedingungen bestens anpassen kann. Hierzu gehören seine Wachstumsfähigkeit unter sowohl aeroben, als auch denitrifizierenden und fermentativen Bedingungen. Die Fähigkeit des anaeroben Wachstums ist zum Beispiel bei der Infektion der teils anaeroben Lungenschleimschicht Cystischer Fibrose PatientInnen sowie für die Ausbildung von Biofilmen von Bedeutung (Hassett *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002; Worlitzsch *et al.*, 2002). Wichtigster globaler Transkriptionsregulator unter anaeroben Bedingungen ist Anr (*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*; Sawers, 1991), wobei *P. aeruginosa* für die Dentrifikation zusätzlich den Transkriptionsregulator Dnr (*dissimilatory nitrate respiration regulator*) benötigt (Arai *et al.*, 1995). Aufgrund dieser zentralen Funktionen von Anr und Dnr als Transkriptionsregulatoren dieser bedeutenden Prozesse war es Ziel dieser Arbeit, die Transkriptome aerob und anaerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen zu untersuchen, sowie eine vergleichende Transkriptomanalyse anaerob gewachsener PAO1 Wildtyp Zellen gegenüber *anr*- und *dnr*-Mutanten durchzuführen.

3.1.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der Durchführung von Transkriptomanalysen. Zuerst mussten die Kultivierungsbedingungen der verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme für einen Vergleich aeroben und anaeroben Wachstums experimentell bestimmt werden. Hierbei sollte vor allem berücksichtigt werden, dass die *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen nicht wachsen kann. Aufgrund dieses Wachstumsphänotyps wurde ein experimenteller Ansatz gewählt mit aerobem Wachstum der Zellen bis in die exponentielle Phase und einem anschließendem Wechsel zu anaeroben Bedingungen. Hierfür wurden die aerob gewachsenen Zellen in ein anaerobes Kulturgefäß überführt und unter Sauerstoffabschluss für einen bestimmten Zeitraum inkubiert.

3.1.1.1 Bestimmung des Zeitpunkts der Zellernte unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Um den richtigen Zeitpunkt für die aerobe Zellernte zu bestimmen, wurden Northern Blots von Gesamt-RNA aus Zellen, die während der logarithmischen Wachstumsphase bei einer $OD_{578} = 0.3, 0.45, 0.6$ und 0.9 sowie in der frühen Stationärphase bei einer $OD_{578} = 1.4$ geerntet wurden, durchgeführt. Als Sonde wurde Digoxigenin-gelabelte RNA des Gens *nirS* verwendet, da aus Untersuchungen von *P. stutzeri* bekannt war, dass das *nirS*-Transkript bereits nach 15-minütiger anaerober Induktion detektierbar ist (Härtig und Zumft, 1999). Eine starke Bildung des *nirS*-Transkripts trat ab einer $OD_{578} = 0.9$ auf, wobei eine leichte Transkription schon bei einer $OD_{578} = 0.6$ detektiert werden konnte. Dies zeigt, dass ein Dnr-abhängiges Gen über eine aktive Anr/Dnr-Kaskade bereits in der aeroben logarithmischen Phase ab einer $OD_{578} = 0.6$ aktiviert wird. Um sicherzustellen, dass die für die aerobe Transkriptomuntersuchung verwendeten Zellen nicht unter dem Einfluss der Regulatoren Anr und Dnr stehen, wurde die Zellernte in den folgenden Experimenten bei einer $OD_{578} = 0.3$ nach aerober Kultivierung vorgenommen.

Für die Festlegung des Zeitpunkts der anaeroben Zellernte wurden Northern Blots der Gesamt-RNA aus Zellen, die nach 30 Minuten, einer, zwei sowie vier Stunden nach dem Wechsel zu anaeroben Bedingungen geerntet wurden, ebenfalls unter Verwendung der *nirS*-Sonde durchgeführt. Eine spätere Ernte wurde nicht in Betracht gezogen, da nach sechsstündiger anaerober Inkubation in Gegenwart von Nitrat der Wildtyp im Gegensatz zur *anr*- bzw. *dnr*-Mutante wieder zu wachsen begann. Die *nirS*-Transkriptbildung war erstmals nach einer Stunde nach dem Wechsel zu anaeroben Bedingungen nachweisbar und erreichte nach zwei Stunden ihr Maximum, so dass für die anaerobspezifische Transkriptomuntersuchung eine zweistündige anaerobe Inkubation gewählt wurde. Eine charakteristische Wachstumskurve des *P. aeruginosa* Wildtyps unter Angabe der Zeitpunkte der Zellernten sowie ein zugehöriger Northern Blot der präparierten RNA unter Verwendung einer *nirS* mRNA spezifischen Sonde sind in Abb. 12 dargestellt.

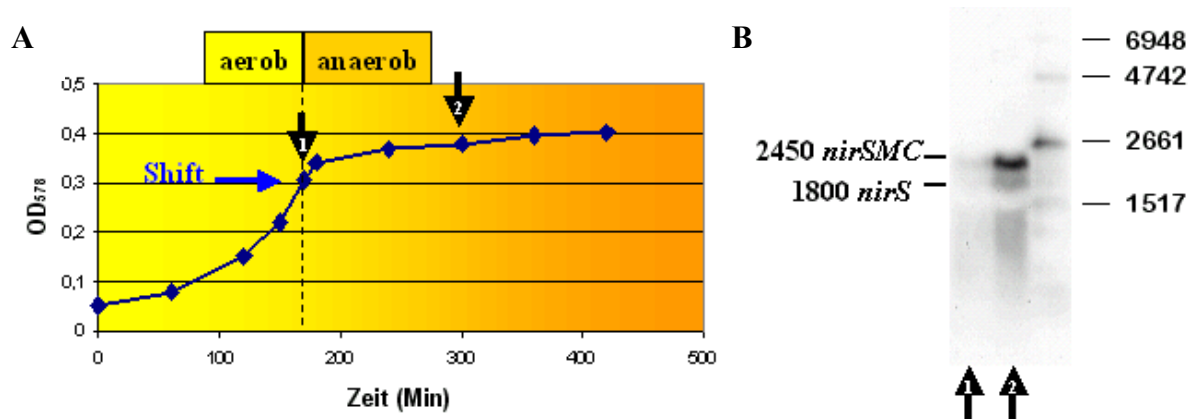


Abb. 12: Darstellung einer Wachstumskurve (A) von Wildtyp *P. aeruginosa* unter Durchführung eines Wechsels von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen bei einer $OD_{578} = 0.3$ sowie eines Northern Blots (B) unter Verwendung einer *nirS*-Sonde. Die aeroben und anaeroben Erntezeitpunkte (A) sowie ein zugehöriger Northern Blot der präparierten RNA unter Verwendung einer *nirS* mRNA spezifischen Sonde (B) sind durch Pfeile markiert. Die Transkription von *nirS* erfolgte hauptsächlich zusammen mit zwei weiteren Genen als *nirSMC*-Transkript mit einer Größe von ca. 2450 nt unter leichter Bildung von *nirS* mRNA mit einer Größe von ca. 1800 nt.

Die Northern Blot Analyse der RNA anaerob inkubierter Zellen unter Verwendung einer *nirS* mRNA spezifischen Sonde ergab zwei Signale der Größen 1800 nt und 2450 nt. Die Zuordnung der Gentranskripte zu diesen Signalen erfolgte sowohl unter Beachtung der chromosomalen Anordnung des *nirS*-Gens als erstem Gen des *nirSMCFDLGHJEN* Gen-Clusters, als auch der dem Gen-Cluster divergenten Orientierung des zu *nirS* stromaufwärts gelegenen Gens *nirQ*. Aufgrund der Größe des *nirS*-Gens von 1707 bp, sowie der Größen der Gene *nirM* (315 bp), *nirC* (360 bp) und *nirF* (1179 bp), wurde das detektierte Signal bei ca. 1800 nt der *nirS* mRNA und das detektierte Signal bei ca. 2450 nt dem *nirSMC*-Transkript zugeordnet (siehe Abb. 13). Ob die Transkription von *nirS* als *nirSMCFDLGHJEN*-Operon mit nachfolgender Prozessierung der mRNA unter Bildung eines *nirSMC*-Transkripts oder als *nirSMC*-Operon erfolgte, war aus den durchgeführten Northern Blot Analysen nicht ersichtlich. Für die Bestimmung der Kultivierungsbedingungen war eine Klärung dieser Frage jedoch nicht notwendig.

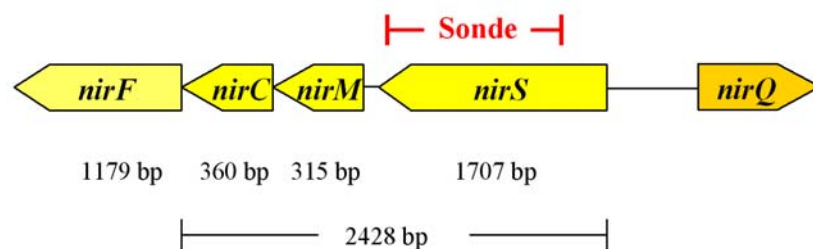


Abb. 13: Darstellung der chromosomalen Anordnung der Gene *nirF*, *nirC*, *nirM*, *nirS* und *nirQ* unter Berücksichtigung ihrer Orientierung und unter Angabe ihrer jeweiligen Größe in Basenpaaren (bp) sowie der Größe eines hypothetischen *nirSMC*-Operons. Die Lage der für die in Abb. 12 gezeigten Northern Blot Analysen benutzten Sonde ist rot gekennzeichnet.

Für die Northern Blot Analyse von präparierter RNA der *anr*- und *dnr*-Mutanten unter Verwendung der *nirS*-Sonde wurde kein Signal erwartet, da die Transkription von *nirS* unter der positiven Kontrolle von Dnr steht (Arai *et al.*, 1995). Für den Nachweis der Aktivität des Regulators Anr in der *dnr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen wurde als Sonde Digoxigenin-gelabelte RNA des Gens *arcA* verwendet, das unter der Kontrolle von Anr steht (Zannoni, 1989; Galimand *et al.*, 1991; Gamper *et al.*, 1992). Es wurden vier Signale der Größen 1400 nt, 2500 nt, 3500 nt und 4900 nt detektiert, die den Gentranskripten von *arcA*, *arcAB*, *arcABC* und *arcDABC* zugeordnet wurden (Abb.14; Gamper *et al.*, 1992).

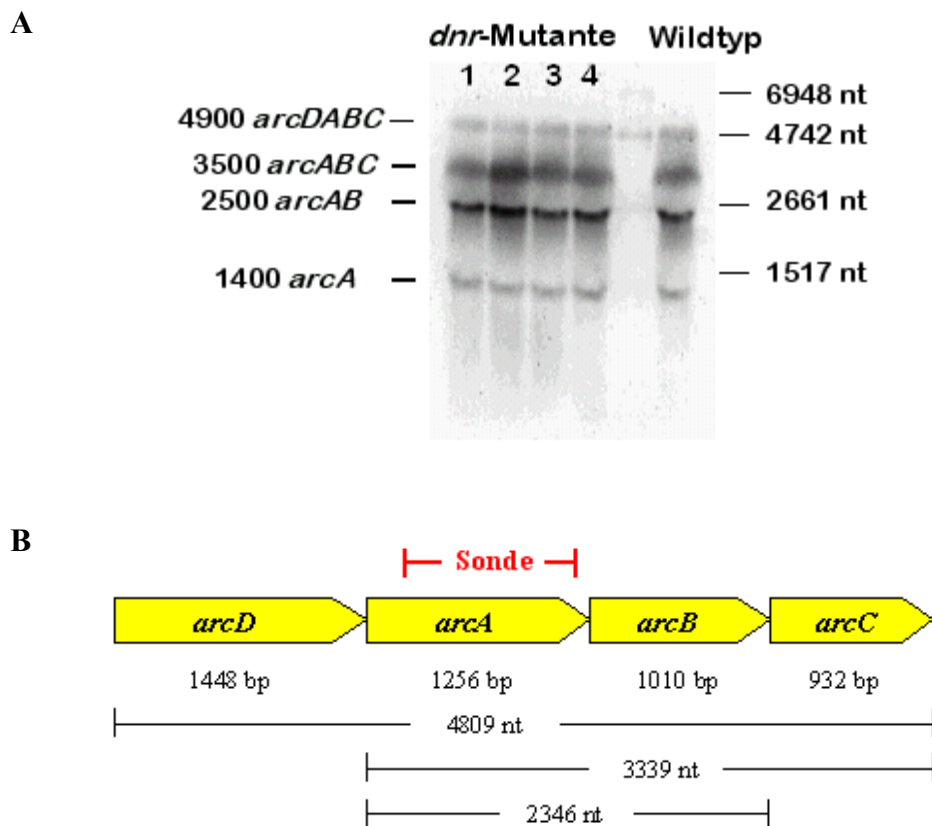


Abb. 14: Darstellung eines Northern Blots unter Verwendung einer *arcA*-Sonde (A) sowie schematische Darstellung des *arcDABC*-Operons (B). (A) Die Transkription von *arcA* erfolgte als *arcDABC*-Transkript (ca. 4900 nt) mit nachfolgender mRNA-Prozessierung (Gamper *et al.*, 1992) unter Bildung der *arcA*- (ca. 1400 nt), *arcAB*- (ca. 2500 nt) und *arcABC*-Transkripte (ca. 3500 nt). (B) Die Größe der einzelnen Gene des *arcDABC*-Operons sind in Basenpaaren (bp) angegeben, die Größe der Transkripte in Nukleotiden (nt). Die Lage der für die Northern Blot Analysen benutzte Sonde ist rot gekennzeichnet.

3.1.1.2 Bestimmung des Mediums zur Kultivierung von *P. aeruginosa* Zellen

Als Medien wurde zum einen das halb-definierte, Phosphat-gepufferte Medium OS sowie das definierte Minimalmedium AB auf ihren Einfluss auf die anaerobe *nirS* Transkription untersucht. Aufgrund der Zugabe geringer Mengen an Hefeextrakt und somit geringer

Mengen an Aminosäuren und Vitaminen zu dem OS-Medium wurde eine schnellere Umstellung auf anaerobes Wachstum und somit eine verstärkte *nirS* Transkription im Gegensatz zum Minimalmedium erwartet. Es konnte jedoch kein deutlicher Unterschied in der *nirS* Transkription detektiert werden, so dass für die folgenden Untersuchungen das definierte Minimalmedium AB, das als einzige Kohlenstoffquelle Glucose beinhaltet, verwendet wurde. Die Nutzung des Minimalmediums gewährte den Vorzug, dass alle Komponenten im Medium definiert waren und eine Umstellung der Bakterien auf andere Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, besonders aber auch die Nutzung der Argininfermentation zur Energiegewinnung, nicht möglich war. Um eine spezifisch durch anaerobe Inkubation verursachte Zellantwort von *P. aeruginosa* zu erhalten, wurde dem Medium bereits beim aeroben Wachstum Nitrat zugegeben. Eine aerobe Nitratatmung konnte ausgeschlossen werden, da die Nitratkonzentration der aeroben Kultur bei einer $OD_{578} = 0.3$ im Vergleich zum unbewachsenen Medium (siehe Kap. 3.1.4.1, Tab. 10) vergleichbar war.

3.1.1.3 Etablierung einer Methode der RNA-Präparation aus *P. aeruginosa* Zellen

Zusätzlich zur Festlegung des idealen Zeitpunkts der Zellernte und des Mediums stellte die Wahl der Methodik der RNA-Präparation einen kritischen Faktor dar. Aufgrund der geringen Halbwertszeit bakterieller mRNA von nur einigen Minuten (Grunberg-Manago, 1999) ist die Menge an vorhandener mRNA immer eine Summe aus Transkriptionseffizienz und mRNA-Stabilität. Um eine repräsentative Zusammensetzung an mRNA zu erhalten, ist eine schnelle und effiziente Präparation notwendig.

Für die Präparation der Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* wurden vier verschiedene Methoden getestet. Hierzu gehörte die Präparation nach Aiba (Aiba *et al.*, 1981), die Verwendung des RNA-Extraktionskits RNeasy von Qiagen, der Einsatz von Trizol zur Stabilisierung der RNA sowie einer weiteren Methode unter Verwendung von heißem Phenol nach von Gabain (von Gabain *et al.*, 1983). Ein Nachteil bei der RNA-Präparation nach Aiba sowie unter Einsatz von Trizol war der große Maßstab, in dem die Präparation durchgeführt werden musste, um eine ausreichende Menge an RNA zu erhalten. Bei der Verwendung von Trizol als auch des RNeasy Kits von Qiagen war außerdem der Kostenpunkt ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Die Wahl fiel demnach auf die von von Gabain beschriebene Methode unter Verwendung von heißem Phenol im zwei ml-Maßstab, die zudem die höchste Ausbeute an Gesamt-RNA lieferte.

3.1.2 Durchführung von Transkriptomanalysen mit *P. aeruginosa* GeneChips

Für die Hybridisierung mit den GeneChips wurde die RNA unter Verwendung unspezifisch bindender hexamerer Primer in die stabilere cDNA revers transkribiert und anschließend fragmentiert. Um nach der Hybridisierung eine Detektion der cDNA-Fragmente zu ermöglichen, wurden diese terminal mit Biotin-ddUTP markiert.

Die Umschreibung der RNA in cDNA ermöglichte einerseits eine einfachere Handhabung der Proben während der Hybridisierung und Detektion. Andererseits wurde aufgrund von Varianzen in der Effizienz der Reversen Transkription einzelner RNAs eine absolute Mengenangabe einzelner Transkripte in der Probe erschwert. Ein Grund für die unterschiedlichen Verhältnisse von RNA und transkribierter cDNA sind Varianzen in der Hybridisierungseffizienz der Primer mit den einzelnen Transkripten während der Reversen Transkription. Des weiteren wird die Effizienz der Reversen Transkription durch die unterschiedlichen Sekundärstrukturen der jeweiligen RNA beeinflusst.

Den größten Wert besitzen Microarrays somit in der vergleichenden Analyse einzelner Transkripte zweier oder mehr Zustände eines Organismus. Hierbei wird von einer gleichbleibenden reversen Transkriptionseffizienz unter Verwendung der RNA desselben Gens bzw. Operons ausgegangen.

Die Fragmentierung der cDNA sollte in einem Fragmentmaximum im Bereich zwischen 50 und 200 Nukleotiden resultieren. Bei zu kleinen Fragmenten ist die Gefahr von Falsch-Hybridisierungen mit den DNA-Oligos auf dem Microarray möglich, wohingegen bei der Verwendung von Fragmenten höherer Nukleotidzahl die Hybridisierungshäufigkeit abnimmt und somit eine verfälschte Signalintensität ausgegeben wird. Somit wurde im Vorfeld der Fragmentierung die Konzentration an DNaseI bestimmt, die ein Fragmentmaximum der erwünschten Nukleotidlänge ergab.

Die Effizienz der anschließenden terminalen Markierung mit Biotin-ddUTP wurde mit Hilfe eines Neutravidin Gel-Shift Assays überprüft und sollte bei mindestens 70 % liegen. Dieser Assay nutzt die Bindung von Biotin an Neutravidin, die in einer veränderten Laufzeit der Biotin-markierten cDNA gegenüber unmarkierter cDNA in Agarose-Gelen resultiert. Die Herstellung der fragmentierten und markierten cDNA erfolgte nach den Protokollen der Firma Affymetrix (High Wycombe, UK).

3.1.3 Auswertung von Transkriptomanalysen mittels *P. aeruginosa* GeneChips

Die Auswertung der Transkriptomdaten erfolgte mit Hilfe der Software von Affymetrix Suite 5.0. Um eine hohe Reproduzierbarkeit sowie Validität der transkriptionellen Expressionsanalyse von *P. aeruginosa* zu gewährleisten ist eine Minimierung biologisch und technisch bedingter Fluktuationen in den Signalintensitäten notwendig. Um die Auswirkungen kulturbedingter Unterschiede auf die Genexpression sowie der nachfolgenden Arbeitsschritte der RNA-Aufreinigung auf die gemessenen Hybridisierungssignale zu reduzieren, wurde RNA aus drei unabhängigen Kulturen vereinigt.

Um Artefakte, die aufgrund von fabrikationsbedingten Abweichungen der GeneChips untereinander sowie Schwankungen in der cDNA-Generierung, Hybridisierung und Fluoreszenzfärbung entstehen können, zu reduzieren, wurden pro Zustand zwei GeneChips hybridisiert und ausgewertet.

Für eine vergleichende Transkriptomanalyse standen nunmehr vier Datensätze zur Verfügung. Zunächst wurden die jeweiligen Datensätze eines Zustandes miteinander verglichen. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe sogenannter Scatter Plots, einer graphischen Darstellung der Signalintensitäten zweier Datensätze eines Wachstumszustands, deren Auftragung gegeneinander eine Diagonale mit einer Steigung von eins ergeben sollte (Abb. 15 A). Anschließend wurde der Pearson-Koeffizient, der die Reproduzierbarkeit der GeneChip-Hybridisierungen angibt, mit 0.95 ± 0.3 ermittelt.

Es folgte ein Kreuzvergleich der vier Datensätze, der als *four-survival method* beschrieben wurde (Chen *et al.*, 2000; Bakay *et al.*, 2002). Die graphische Darstellung sollte auch bei einem Vergleich zweier Datensätze verschiedener Zustände eine Gerade mit der Steigung eins ergeben, jedoch mit einem erniedrigten Pearson-Koeffizienten. Im Falle des Vergleichs der Transkriptomdaten aerob gewachsener mit anaerob induzierten *P. aeruginosa*-Zellen ergab sich ein Pearson-Koeffizient von 0.83 ± 0.04 , der somit den unterschiedlich regulierten Genen Rechnung trägt (Abb. 15 B). Aufgrund dieses Vierfach-Vergleiches wurde die Anzahl an Genen, die in Einzelvergleichen noch als signifikant reguliert ausgegeben wurden, stark reduziert.

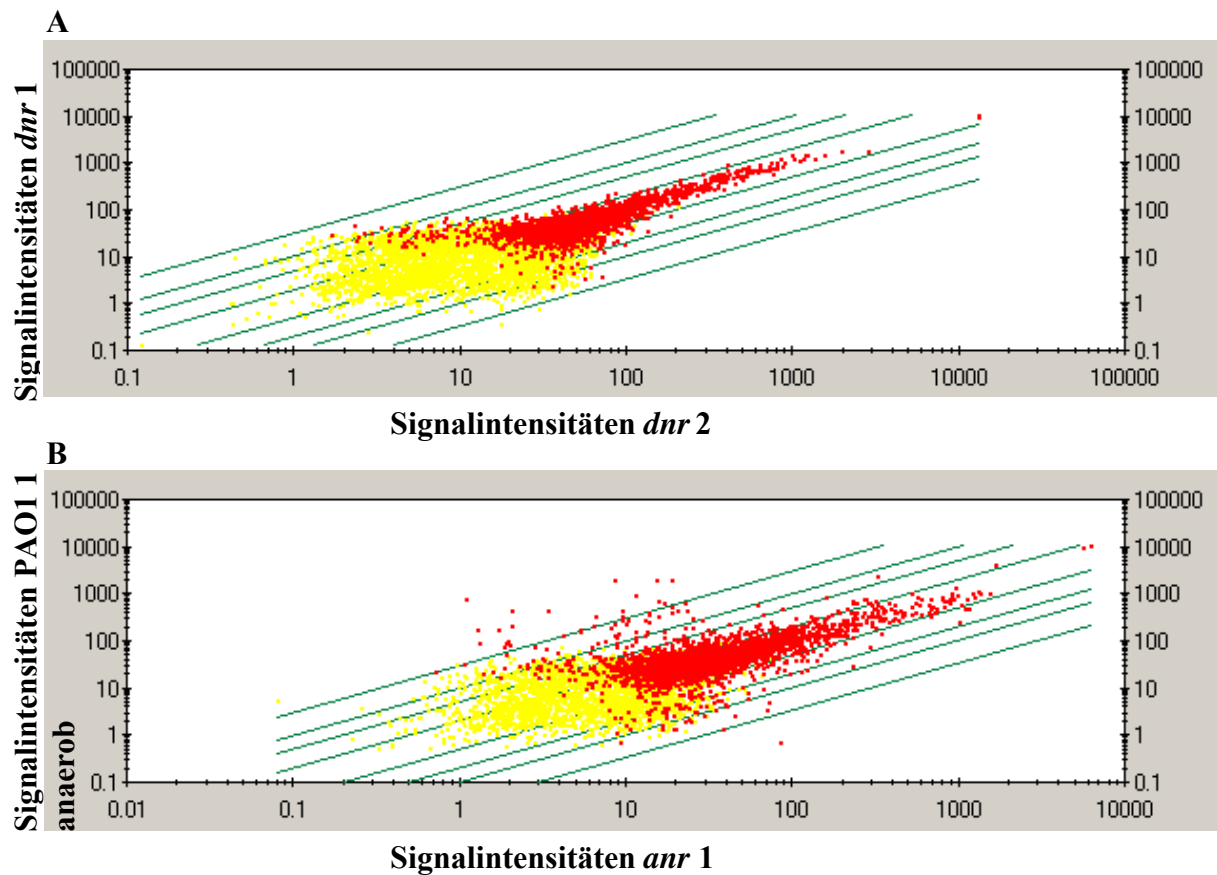


Abb. 15: Darstellung zweier Scatter Plots. Plot A zeigt den Vergleich der Signalintensitäten der Transkripte zweier *dnr*-Mutanten-Kulturen (*dnr* 1 und *dnr* 2) unter anaeroben Bedingungen, Plot B ist die graphische Darstellung des Vergleichs der Signalintensitäten der Transkripte des Wildtyps PAO1 1 sowie der *anr*-Mutante 1 unter anaeroben Bedingungen. Die in Rot dargestellten Punkte entsprechen Signalintensitäten von Transkripten, die in einer der zu analysierenden Kulturen über dem Detektionsgrenzwert lagen und somit als *present* detektiert wurden. Die in Gelb dargestellten Punkte repräsentieren Transkripte, deren Signalintensitäten in beiden Kulturen unterhalb des Detektionsgrenzwertes lagen und somit als *absent* ausgegeben wurden. Die Linien entsprechen einer 2-, 5-, 10- sowie 30-fachen Induktion bzw. Reprimierung.

Eine Regulation wurde demnach als signifikant gewertet, wenn bei einer Induktion beide Signale des induzierten Transkripts von der Software als *present* oder *marginal* angegeben wurden und der Mittelwert der Signalintensitäten oberhalb eines Grenzwertes von 40 lag. Die Höhe des Grenzwertes wurde aufgrund der in Abb. 15 ersichtlichen Streuung der Datenpaare von der Diagonalen unterhalb dieser Signalintensität festgelegt. Des weiteren musste der Mittelwert der differentiellen Expression der vier Einzelvergleiche mindestens ein Signalintensitäts-Verhältnis von zwei aufweisen und die qualitative Beurteilung der differentiellen Genregulationen (*change*) musste von der Software in mindestens drei der vier Vergleiche als (*marginal*) *increased* bzw. (*marginal*) *decreased* angegeben sein.

3.1.4 Transkriptomanalyse von *P. aeruginosa*-Zellen unter aeroben gegenüber anaeroben Wachstumsbedingungen

Für die Identifizierung anaerob gegenüber aerob induzierter Gene von *P. aeruginosa* Wildtyp Zellen, wurden diese erst aerob bei 37°C und 200 rpm in einem Schikanekolben bis zu einer $OD_{578} = 0.3$ kultiviert, ein Teil der Zellen geerntet und der andere Teil in ein anaerobes Kulturgefäß überführt. Nach zwei Stunden Inkubation unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen geerntet. Nach Aufschluss der Zellen wurde die mRNA extrahiert und mittels Northern Blot-Analyse unter Verwendung der *nirS*-Sonde auf eventuelle Degradation durch RNasen sowie die Aktivität der Anr/Dnr-Kaskade überprüft. Die mRNA wurde daraufhin nach den bereitgestellten Protokollen der Firma Affymetrix (High Wycombe, UK) in cDNA umgeschrieben und fragmentiert. Die Hybridisierung der GeneChips wurde von T. Töpfer an der Affymetrix Core Facility an der GBF in Braunschweig durchgeführt.

Insgesamt konnte mit den Affymetrix GeneChips die Transkription von 1486 Genen unter aeroben Wachstumsbedingungen und von 1216 Genen unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Die vergleichende Transkriptomanalyse ergab 166 unter anaeroben gegenüber aeroben Wachstumsbedingungen induzierte und 247 reprimierte Gene. In Abb. 16 sind die Gene in Gruppen nach der Stärke ihrer Regulation eingeteilt. Interessant ist, dass drei Fünftel der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen differentiell regulierten Gene reprimiert wurden, die Stärke ihrer Regulation im Vergleich zu den induzierten Genen jedoch deutlich geringer ausfiel. Das Repressionsmaximum lag bei zehnfach, wobei nur 20 % (49) der reprimierten Gene stärker als fünffach reguliert waren. Demgegenüber lag das Induktionsmaximum bei 150-fach und 48 % (79) der induzierten Gene waren stärker als fünffach reguliert.

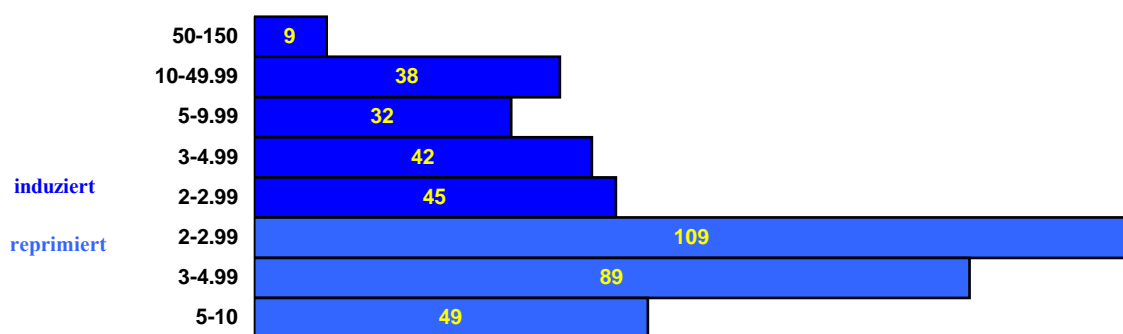


Abb. 16: Einteilung der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten und reprimierten Gene nach der Stärke ihrer Regulation. Induktionen und Repressionen sind in n-fach (Zahlen links neben den Balken) angegeben. Die Anzahl der betroffenen Gene ist in den Balken selbst vermerkt.

Abb. 17 zeigt die Einteilung der unterschiedlich regulierten Gene in funktionelle Klassen (nach www.pseudomonas.com). Auffallend ist, dass 42 % (104) der unter anaeroben Bedingungen reprimierten Gene zu den funktionellen Klassen Transkription und Translation, sowie Nukleotid- und Aminosäurebiosynthese und -metabolismus gehörten, wohingegen nur knapp 5 % (8) der anaerob induzierten Gene diesen Klassen zugeteilt wurden. Die Ursache hierfür lag im Versuchsaufbau. Um die Zellantwort bei einer Umstellung von aeroben zu anaeroben Lebensbedingungen auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurde das Expressionsprofil aerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen mit dem anaerob inkubierter, nicht wachsender Zellen verglichen. Die Umstellung auf die anaerobe Umgebung entsprach einer Stresssituation, in der sich die Zellen auf den alternativen Elektronenakzeptor Nitrat einstellen mussten. Dies bewirkte einen zeitweiligen Wachstumsstopp, während dem *P. aeruginosa* die Expression der Transkriptions- und Translationsmaschinerie konsequenterweise reprimierte. Erst nach 6 h anaerober Inkubation fingen die *P. aeruginosa* Wildtyp-Zellen wieder an zu wachsen und 8 h nach der Umstellung auf denitrifizierende Bedingungen erreichten die Zellen wieder exponentielles Wachstum.

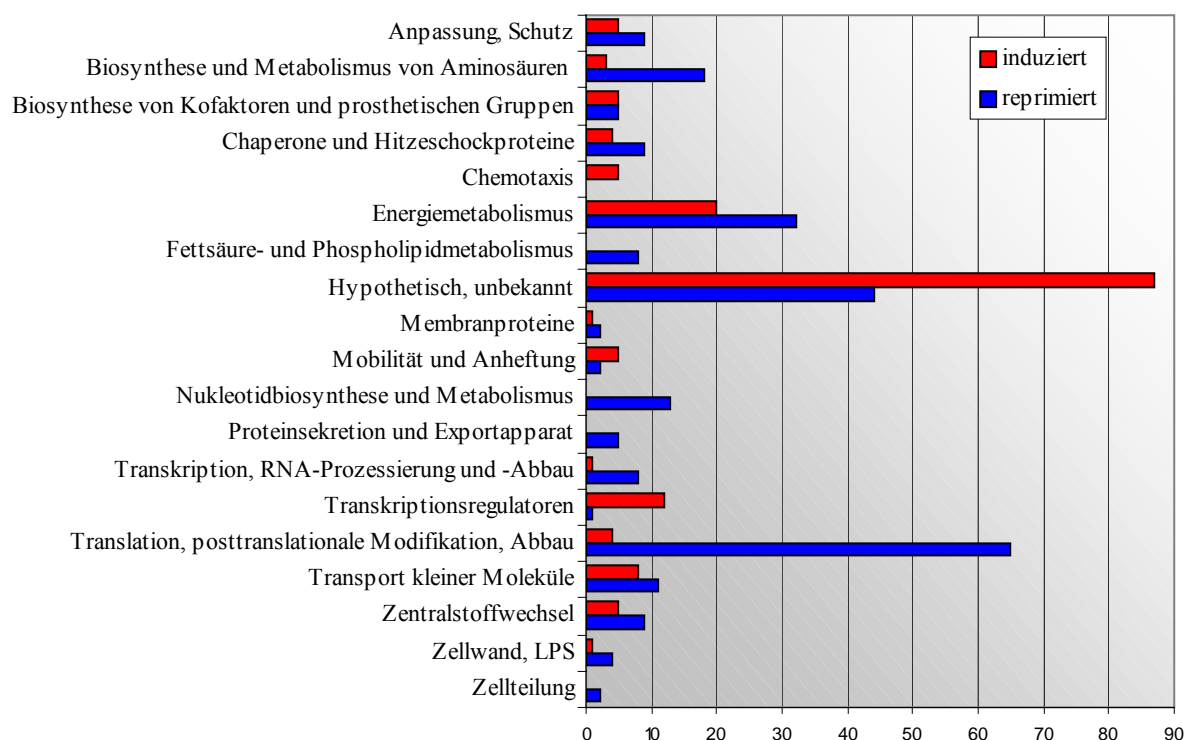


Abb. 17: Einteilung der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten (rot) und reprimierten (blau) Gene von *P. aeruginosa* in funktionelle Klassen (nach www.pseudomonas.com). Die Größe der Balken gibt die Anzahl der regulierten Gene der entsprechenden funktionellen Klasse an.

3.1.4.1 13 % der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen regulierten Gene von *P. aeruginosa* gehören dem Energiemetabolismus an

Mit je 13 % der unter anaeroben Bedingungen reprimierten (32) als auch induzierten (21) Gene konnte ein Grossteil der regulierten Gene dem Energiemetabolismus zugeordnet werden (Abb. 17). Da die Gene dieser Gruppe notwendig für das Überleben der Zellen sind, ist es verständlich, dass einige der am stärksten regulierten Gene, wie z.B. die Gene des Nitritreduktase-Operons, der *cbb₃*-Oxidasen sowie des *arc*-Operons, letztere kodierend für Enzyme der Argininfermentation, in dieser Gruppe zu finden waren.

Für die Umstellung auf anaerobes Wachstum benötigt *P. aeruginosa* einen alternativen Elektronenakzeptor, der im vorliegenden Experiment in Form von Nitrat dem Medium zugegeben wurde. Die Detektion von Nitrat erfolgt mittels der Sensor-Histidin-Kinase NarX, die das Signal an den Antworttranskriptionsregulator NarL weiterleitet (Walker *et al.*, 1993), dessen Transkript unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen 8.7-fach induziert war. Eine Veränderung in der Signalintensität der Transkripte der für die Nitratatmung verantwortlichen Gene des *narK₁K₂GHJI*-Operons konnte nicht detektiert werden, das darauf hinweist, dass die Zellen sich noch in der Adaptionsphase befanden. Dies wurde mit Hilfe von Nitrat- und Nitritmessungen des unbewachsenen Mediums sowie der aeroben und anaeroben Kulturen bestätigt, demzufolge nach einer zweistündigen anaeroben Inkubation eine Abnahme von nur 2.2 mM Nitrat detektiert wurde unter Produktion von 110 µM Nitrit (Tab. 10).

Tab. 10: Nitrat- und Nitritkonzentrationen aerober und anaerober *P. aeruginosa*-Kulturen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in AB-Minimalmedium mit 20 mM Glucose und 50 mM Nitrat. Die Nitrat- und Nitritmessungen erfolgten vor der Beimpfung des Mediums mit *P. aeruginosa*, aerob bei einer OD₅₇₈ = 0.3 sowie anaerob nach 1 und 2 h.

	Nitrat [mM]	Nitrit [µM]
Medium	44.12	0.15
aerob OD ₅₇₈ = 0.3	44.12	4.04
1 h anaerobe Induktion	42.22	68.11
2 h anaerobe Induktion	41.94	111.13

Im Gegensatz zur Transkription des Nitratreduktase-Operons waren die Gene des *nirSMC*-Operons, kodierend für die Nitritreduktase, sowie deren physiologische Elektronendonoren Cytochrom *c₅₅₁* (NirM) (Arai *et al.*, 1990) und dem *c*-Typ Cytochrom NirC (Hasegawa *et al.*, 2001) unter anaeroben gegenüber aeroben Wachstumsbedingungen bis zu 52-fach induziert. Ebenfalls stark induziert war die Transkription der Gene der Stickstoffmonoxid-Oxidase NorCB (bis zu 27.9-fach). Diese starke Transkriptionsinduktion der Nitrit- und NO-

Reduktasegene unter anaeroben Bedingungen ist notwendig, um sowohl gebildetes Nitrit als auch NO, beides potente Zellgifte, direkt abbauen zu können.

Weitere Unterschiede konnten in der Transkription der *cbb₃*-Oxidasen detektiert werden, die als Endoxidasen molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser reduzieren. Interessanterweise verweisen die durch die Transkriptomanalyse gewonnenen Daten auf eine unterschiedliche Regulation der beiden in *P. aeruginosa* vorhandenen *cbb₃*-Oxidasen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. So konnte eine bis zu 7.2-fache Reprimierung der Transkription der *cbb₃*-Oxidase 1 -Gene (PA1552-PA1554) und eine bis zu 27.4-fachen Induktion der *cbb₃*-Oxidase 2 -Gene (PA1555-PA1557) unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten vor kurzem Comolli und Donohue, die eine prominente Rolle der Oxidase 1 unter aeroben Bedingungen sowie der Anr-abhängigen Oxidase 2 unter mikroaeroben Bedingungen feststellten (Comolli und Donohue, 2004).

Ebenfalls dem Energiemetabolismus zugehörig und bis zu 149.6-fach induziert unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen waren die Gene des Operons *arcDABC*, kodierend für Enzyme der Argininfermentation. Hierzu gehören die Arginindeiminase ArcA, die Carbamoyltransferase ArcB und die Carbamatkinase ArcC, sowie ArcD, ein Arginin/Ornithin Antiporter. Es ist bekannt, dass das *arc*-Operon unter der positiven Kontrolle der zwei Transkriptionsregulatoren ArgR und Anr steht, wobei ArgR gleichzeitig Sensor von Arginin sowie DNA-bindender Transkriptionsaktivator ist (Lu *et al.*, 1999). Interessant ist, dass dem Medium kein Arginin zugegeben worden war, so dass die hohe Transkriptionsinduktion des *arc*-Operons wahrscheinlich allein als Reaktion auf die anaerobe Induktion durch Anr zu werten ist.

Des weiteren induziert unter anaeroben Bedingungen war die Transkription von Genen, die für Enzyme kodieren, die an fermentativen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Hierzu gehören die Alkoholdehydrogenase AdhA (PA5427, 128-fach), die Phosphatacetyltransferase Pta (PA0835, 6.3-fach) sowie die Acetatkinase AckA (PA0836, 5.2-fach). Obwohl *P. aeruginosa* allgemein als nicht-fermentierendes Bakterium gilt, konnte vor kurzem in unserer Gruppe gezeigt werden, dass dieses Bakterium die Fähigkeit besitzt, mittels Expression der Gene *pta* und *ackA* die Pyruvatfermentation zum Langzeitüberleben zu nutzen (Eschbach *et al.*, 2004). Die starke anaerobe Transkriptionsinduktion dieser Gene selbst in Abwesenheit der für die Fermentation notwendigen Edukte, verweist auf die schnelle Einstellung von *P. aeruginosa* auf sich ändernde Umweltbedingungen, die diesem Bakterium einen Überlebensvorteil gegenüber anderen Bakterien in derselben ökologischen Nische sichern kann.

Tab. 11: Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene des Energiemetabolismus unter Angabe der Regulationsstärke (in n-fach) und der zugehörigen kodierten Proteine. Die Beschreibung der Proteine wurde der Pseudomonas Datenbank entnommen (www.pseudomonas.com). Für die Gene *atpC* und *atpI* des Operons *atpCDGHFEI* konnte keine Regulation detektiert werden.

PA-Nummer	Gen/Operon	anaerob vs. aerob	Protein
PA0517-0519	<i>nirSMC</i>	52 . 0	nitrite reduction
PA0523-0524	<i>norCB</i>	27 . 9	nitric-oxide reductase
PA0835	<i>pta</i>	6 . 3	phosphate acetyltransferase
PA0836		5 . 2	probable acetate kinase
PA1555-1557		27 . 4	cytochrome <i>c</i> oxidase-2 (<i>cbb₃</i> -type)
PA2297		3 . 6	probable ferredoxin
PA2664	<i>fhp</i>	69 . 8	flavohemoprotein
PA3879	<i>narL</i>	8 . 7	two-component response regulator NarL
PA4571		6 . 3	probable cytochrome <i>c</i>
PA4587	<i>ccpR</i>	4 . 8	cytochrome <i>c₅₅₁</i> peroxidase precursor
PA4922	<i>azu</i>	2 . 3	azurin precursor
PA5170-5173	<i>arcDABC</i>	149 . 6	arginine fermentation
PA5427	<i>adhA</i>	128 . 0	alcohol dehydrogenase
PA1552-1554		-7 . 2	cytochrome <i>c</i> oxidase-1 (<i>cbb₃</i> -type)
PA1580	<i>gltA</i>	-2 . 3	citrate synthase
PA1581-1584	<i>sdhCDAB</i>	-3 . 7	succinate dehydrogenase
PA1585	<i>sucA</i>	-2 . 3	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit)
PA1586	<i>sucB</i>	-2 . 6	dihydrolipoamide succinyltransferase (E2 subunit)
PA1587	<i>lpdG</i>	-2 . 2	lipoamide dehydrogenase-glc
PA1588-1589	<i>sucCD</i>	-3 . 8	succinyl-CoA synthetase
PA1787	<i>acnB</i>	-2 . 8	aconitate hydratase 2
PA2648	<i>nuoM</i>	-2 . 0	NADH dehydrogenase I chain M
PA2649	<i>nuoN</i>	-2 . 1	NADH dehydrogenase I chain N
PA3621	<i>fdxA</i>	-2 . 4	ferredoxin I
PA4333		-3 . 1	probable fumarase
PA4429		-3 . 9	probable cytochrome <i>c₁</i> precursor
PA4430		-6 . 4	probable cytochrome <i>b</i>
PA4640	<i>mgoB</i>	-2 . 1	malate:quinone oxidoreductase
PA4748	<i>tpiA</i>	-3 . 5	triosephosphate isomerase
PA5192	<i>pckA</i>	-3 . 0	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PA5300	<i>cycB</i>	-3 . 7	cytochrome <i>c₅</i>
PA5490	<i>cc4</i>	-2 . 3	cytochrome <i>c₄</i> precursor
PA5553-5561	<i>atpCDGHFEI</i>	-5 . 8	ATP synthase

Weiterhin war die Transkription des Gens PA4587, kodierend für die Cytochrom *c₅₅₁* Peroxidase CcpR, unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen 4.8-fach induziert. Diese Peroxidase, ein periplasmatisches Membranprotein, schützt die Zelle vor toxischen Peroxiden (Ellfolk *et al.*, 1991; Fülöp *et al.*, 1995). Die Elektronen für die Reduktion der Peroxide erhält CcpR vermutlich von den Elektronenüberträgern Ferrocyclochrom *c₅₅₁* sowie dem Kupferhaltigen Protein Azurin (PA4922; Foote *et al.*, 1992, Fülöp *et al.*, 1995), deren Transkripte ebenfalls unter anaeroben Bedingungen induziert waren (8.4-fach bzw. 2.3-fach). Als mögliche Redoxpartner für Azurin wurden durch *in vitro* Tests das Cytochrom *c₅₅₁* (NirM)

sowie die Nitritreduktase NirS vorgeschlagen (Horio, 1958; Wilson *et al.*, 1975; Corin *et al.*, 1983; Van de Kamp *et al.*, 1990; Silvestrini *et al.*, 1994), deren Transkripte, wie bereits erwähnt, ebenfalls stark induziert waren. *In vivo* Tests mit einer Azurin-Mutante konnten jedoch eine Beteiligung von Azurin bei der dissimilatorischen Nitratreduktion nicht bestätigen (Vijgenboom *et al.*, 1997). Die vorgeschlagene Rolle als Elektronendonator für die Peroxidase CcpR hingegen konnte aufgrund der Sensibilisierung der Azurin-Mutante gegenüber Wasserstoffperoxid sowie dem Sauerstoffradikalbildner Paraquat von Vijgenboom *et al.* bestätigt werden (Vijgenboom *et al.*, 1997).

Unter anaeroben Bedingungen reprimiert waren hingegen Gene, die für Enzyme des Citronensäurecyclus kodieren, wie z.B. die Succinatdehydrogenase, sowie Gene kodierend für die ATP-Synthase. Die Repression der Transkription dieser Gene ist vermutlich auf den Wachstumsstillstand nach der Überführung der aeroben Kultur in anaerobe Kulturgefäße zurückzuführen.

3.1.4.2 Die Regulation von 33 % der unter anaeroben Bedingungen regulierten Gene ist auf den durch anaerobe Inkubation zuvor aerober *P. aeruginosa*-Zellen verursachten Energiemangel zurückzuführen

Für *E. coli* ist bekannt, dass bei Eintritt in die Stationärphase die Translationsmaschinerie reprimiert wird. So werden beispielsweise durch den Wachstumsstop überschüssige Ribosomen in translational inaktive 100S-Dimere mit Hilfe des Proteins Rmf (*ribosomal modulation factor*) umgewandelt (Yamagishi *et al.*, 1993; Wada *et al.*, 1995). Rmf wird des weiteren für das Langzeitüberleben in der Stationärphase benötigt (Yamagishi *et al.*, 1993). Der Wechsel von logarithmisch gewachsenen aeroben *P. aeruginosa*-Zellen zu anaeroben Bedingungen, einhergehend mit einem Wachstumsstop während der Adaption auf Nitratatmung, scheint in bezug auf die Translationsmaschinerie ähnliche Auswirkungen zu haben, wie der Eintritt in eine Stationärphase. Zum einen waren die Transkripte von 48 der 57 Gene, kodierend für ribosomale Proteine, unter anaeroben Bedingungen reprimiert, zum anderen war die Transkription des Gens *rmf*, dessen zugehöriges Protein für die Umwandlung in inaktive 100S-Dimere benötigt wird, unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen 6,4-fach induziert (Tab. 12).

In Zusammenhang mit dem Wachstumsstop steht auch die Transkriptionsreprimierung von Genen, deren zugehörige Proteine an der Biosynthese und am Metabolismus der Nukleinsäuren und Aminosäuren, sowie an der Translation und posttranslationalen Modifikationen beteiligt sind (Tab. 12). Im Zuge des Wachstumsstops und der Umstellung

auf sich ändernde Umweltbedingungen wurden vermutlich nicht benötigte Proteine mittels der Proteasen ClpA, ClpB und einer hypothetischen Protease, kodiert durch das Gen PA0459, abgebaut, deren Transkripte nach zweistündiger anaerober Induktion bis zu 10.6-fach induziert waren.

Tab. 12: Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene, deren Regulation vermutlich eine Reaktion auf den durch anaerobe Induktion aerober *P. aeruginosa* Zellen verursachten Energiemangel darstellt.

PA-Nummer	Gen	anaerob vs aerob	Protein/ Funktion	PA-Nummer	Gen	anaerob vs aerob	Protein/ Funktion
Aminosäurebiosynthese und -metabolismus							
PA5304	<i>dadA</i>	52.0	D-amino acid dehydrogenase	PA4442	<i>cysN</i>	-3.0	ATP sulfurylase GTP-binding subunit
PA5429	<i>aspA</i>	3.5	aspartate ammonia-lyase	PA4443	<i>cysD</i>	-3.8	ATP sulfurylase
PA5495	<i>thrB</i>	3.6	homoserine kinase	PA4449	<i>hisG</i>	-2.7	ATP-phosphoribosyltransferase
PA0036	<i>trpB</i>	-4.4	tryptophan synthase	PA4588	<i>gdhA</i>	-2.0	glutamate dehydrogenase
PA0316	<i>serA</i>	-2.5	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PA4602	<i>glyA3</i>	-3.3	serine hydroxymethyltransferase
PA0904	<i>lysC</i>	-3.5	aspartate kinase	PA4694	<i>ilvC</i>	-2.5	ketol-acid reductoisomerase
PA1750		-2.9	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	PA4695	<i>ilvH</i>	-2.9	acetolactate synthase isozyme III
PA3525	<i>argG</i>	-3.7	argininosuccinate synthase	PA4696	<i>ilvI</i>	-3.6	acetolactate synthase
PA3537	<i>argF</i>	-2.2	ornithine carbamoyltransferase, anabolic	PA4756	<i>carB</i>	-2.2	carbamoylphosphate synthetase
PA3736	<i>hom</i>	-7.0	homoserine dehydrogenase	PA4846	<i>aroQ1</i>	-2.7	3-dehydroquinate dehydratase
				PA5142	<i>hisH1</i>	-2.4	glutamine amidotransferase
Kohlenstoffmetabolismus und zentraler Stoffwechsel							
PA0265	<i>gabD</i>	3.5	succinate-semialdehyde dehydrogenase	PA0546	<i>metK</i>	-2.4	methionine adenosyltransferase
PA2260		2.3	hypothetical protein	PA0654	<i>speD</i>	-4.4	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme
PA4726	<i>cbrB</i>	2.5	two-component response regulator CbrB	PA1770	<i>ppsA</i>	-2.3	phosphoenolpyruvate synthase
PA0887	<i>acsA</i>	2.7	acetyl-coenzyme A synthetase	PA1838	<i>cysI</i>	-3.9	sulfite reductase
PA4880		4.1	probable bacterioferritin	PA4031	<i>ppa</i>	-4.1	inorganic pyrophosphatase
PA5060	<i>phaF</i>	2.8	polyhydroxyalkanoate synthesis protein PhaF	PA5046		-6.4	malic enzyme
PA3635	<i>eno</i>	-2.3	enolase	PA5436		-3.2	probable biotin carboxylase subunit of a transcarboxylase
PA5351	<i>rubA1</i>	-10.2	Rubredoxin 1				
DNA-Metabolismus							
PA4723	<i>dksA</i>	-3.4	suppressor protein DksA				
Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus							
PA1609	<i>fabB</i>	-3.2	beta-ketoacyl-ACP synthase I	PA3639	<i>accA</i>	-2.3	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase
PA1610	<i>fabA</i>	-3.5	beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydrase	PA3645	<i>fabZ</i>	-2.3	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase
PA2966	<i>acpP</i>	-2.5	acyl carrier protein	PA4847	<i>accB</i>	-4.1	biotin carboxyl carrier protein (BCCP)
PA2967	<i>fabG</i>	-2.8	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	PA4848	<i>accC</i>	-3.0	biotin carboxylase
Nukleotidbiosynthese und -metabolismus							
PA0945	<i>purM</i>	-2.6	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	PA3654	<i>pyrH</i>	-2.6	uridylate kinase
PA1013	<i>purC</i>	-2.5	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	PA3686	<i>adk</i>	-2.4	adenylate kinase
PA1155	<i>urdB</i>	-2.7	ribonucleoside reductase	PA3807	<i>ndk</i>	-3.7	nucleoside diphosphate kinase
PA1156	<i>urdA</i>	-2.9	ribonucleoside reductase	PA4670	<i>prs</i>	-5.3	ribose-phosphate pyrophosphokinase
PA2629	<i>purB</i>	-5.1	adenylosuccinate lyase	PA4758	<i>carA</i>	-3.2	carbamoyl-phosphate synthase
PA3480		-2.0	probable deoxycytidine triphosphate deaminase	PA5129	<i>grx</i>	-2.1	glutaredoxin
				PA5426	<i>purE</i>	-5.4	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
Transkription, RNA-Prozessierung und -abbau							
PA4937	<i>rnr</i>	2.1	exoribonuclease RNase R	PA4275	<i>nusG</i>	-5.8	transcription antitermination protein NusG
PA2976	<i>rne</i>	-2.8	ribonuclease E	PA4740	<i>pnp</i>	-2.5	polynucleotide nucleotidyltransferase
PA3743	<i>trmD</i>	-6.5	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	PA4745	<i>nusA</i>	-2.1	N utilization substance protein A
PA3744	<i>rimM</i>	-4.9	16S rRNA processing protein	PA4853	<i>fis</i>	-2.8	DNA-binding protein Fis
PA4238	<i>rpoA</i>	-5.0	DNA-directed RNA polymerase				

Translation, posttranslationale Modifikation und Proteinabbau					
PA0459		10.6	probable ClpA/B protease	PA4253	<i>rplN</i> -2.7 50S ribosomal protein L14
PA2620	<i>clpA</i>	2.2	ATP-binding protease component ClpA	PA4254	<i>rpsQ</i> -3.4 30S ribosomal protein S17
PA3049	<i>rmf</i>	6.4	ribosome modulation factor	PA4255	<i>rpmC</i> -3.1 50S ribosomal protein L29
PA4542	<i>clpB</i>	4.9	ClpB protein	PA4256	<i>rplP</i> -3.4 50S ribosomal protein L16
PA0579	<i>rpsU</i>	-4.8	30S ribosomal protein S21	PA4257	<i>rpsC</i> -3.2 30S ribosomal protein S3
PA0956	<i>proS</i>	-2.2	prolyl-tRNA synthetase	PA4258	<i>rplV</i> -3.7 50S ribosomal protein L22
PA0963	<i>aspS</i>	-2.1	aspartyl-tRNA synthetase	PA4259	<i>rpsS</i> -4.1 30S ribosomal protein S19
PA1795	<i>cysS</i>	-9.8	cysteinyl-tRNA synthetase	PA4260	<i>rplB</i> -3.9 50S ribosomal protein L2
PA2619	<i>infA</i>	-6.4	initiation factor	PA4261	<i>rplW</i> -6.0 50S ribosomal protein L23
PA2740	<i>pheS</i>	-2.3	phenylalanyl-tRNA synthetase	PA4262	<i>rplD</i> -5.5 50S ribosomal protein L4
PA2744	<i>thrS</i>	-2.0	threonyl-tRNA synthetase	PA4263	<i>rplC</i> -5.5 50S ribosomal protein L3
PA2755	<i>eco</i>	-3.4	ecotin precursor	PA4264	<i>rpsJ</i> -5.1 30S ribosomal protein S10
PA2851	<i>efp</i>	-3.9	translation elongation factor P	PA4265	<i>tufA</i> -3.2 elongation factor Tu
PA2970	<i>rpmF</i>	-6.7	50S ribosomal protein L32	PA4266	<i>fusA1</i> -5.4 elongation factor G
PA3162	<i>rpsA</i>	-4.9	30S ribosomal protein S1	PA4267	<i>rpsG</i> -4.8 30S ribosomal protein S7
PA3653	<i>frf</i>	-3.1	ribosome recycling factor	PA4268	<i>rpsL</i> -7.2 30S ribosomal protein S12
PA3655	<i>tsf</i>	-6.0	elongation factor Ts	PA4271	<i>rplL</i> -3.9 50S ribosomal protein L7 / L12
PA3656	<i>rpsB</i>	-3.4	30S ribosomal protein S2	PA4272	<i>rplJ</i> -4.9 50S ribosomal protein L10
PA3700	<i>lysS</i>	-3.1	lysyl-tRNA synthetase	PA4273	<i>rplA</i> -3.0 50S ribosomal protein L1
PA3742	<i>rplS</i>	-3.9	50S ribosomal protein L19	PA4274	<i>rplK</i> -2.8 50S ribosomal protein L11
PA3745	<i>rpsP</i>	-6.0	30S ribosomal protein S16	PA4432	<i>rpsI</i> -7.9 30S ribosomal protein S9
PA3834	<i>valS</i>	-3.6	valyl-tRNA synthetase	PA4433	<i>rplM</i> -6.6 50S ribosomal protein L13
PA4237	<i>rplQ</i>	-3.0	50S ribosomal protein L17	PA4563	<i>rpsT</i> -7.3 30S ribosomal protein S20
PA4239	<i>rpsD</i>	-4.8	30S ribosomal protein S4	PA4567	<i>rpmA</i> -3.4 50S ribosomal protein L27
PA4240	<i>rpsK</i>	-4.7	30S ribosomal protein S11	PA4568	<i>rplU</i> -4.4 50S ribosomal protein L21
PA4241	<i>rpsM</i>	-5.6	30S ribosomal protein S13	PA4665	<i>prfA</i> -10.4 peptide chain release factor 1
PA4242	<i>rpmJ</i>	-4.4	50S ribosomal protein L36	PA4671	-3.1 probable ribosomal protein L25
PA4244	<i>rplO</i>	-5.6	50S ribosomal protein L15	PA4672	-4.0 peptidyl-tRNA hydrolase
PA4245	<i>rpmD</i>	-5.0	50S ribosomal protein L30	PA4741	<i>rpsO</i> -2.3 30S ribosomal protein S15
PA4246	<i>rpsE</i>	-6.8	30S ribosomal protein S5	PA5049	<i>rpmE</i> -2.7 50S ribosomal protein L31
PA4247	<i>rplR</i>	-6.6	50S ribosomal protein L18	PA5315	<i>rpmG</i> -4.3 50S ribosomal protein L33
PA4248	<i>rplF</i>	-6.3	50S ribosomal protein L6	PA5316	<i>rpmB</i> -6.8 50S ribosomal protein L28
PA4249	<i>rpsH</i>	-5.8	30S ribosomal protein S8	PA5569	<i>rnpA</i> -4.2 ribonuclease P protein component
PA4251	<i>rplE</i>	-2.4	50S ribosomal protein L5	PA5570	<i>rpmH</i> -4.9 50S ribosomal protein L34
PA4252	<i>rplX</i>	-2.5	50S ribosomal protein L24		

3.1.4.3 Die Regulation von 23 % der unter anaeroben Bedingungen regulierten Gene ist auf Sauerstoffmangel zurückzuführen

Tab. 13 hingegen gibt einen Überblick über Gene, die vermutlich nicht aufgrund des Wachstumsstops, sondern als Reaktion auf das anaerobe Milieu, induziert bzw. reprimiert wurden. Auffallend ist, dass Gene, deren zugehörige Proteine der Zelle Schutz vor Sauerstoff und radikalen Sauerstoffmetaboliten bieten, unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induziert waren. Hierzu gehört die Katalase A, die durch die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser die Zelle vor oxidativem Schaden schützt (Hassett *et al.*, 1992) und deren Transkript unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen 4.3-fach induziert war. Ebenfalls anaerob induziert war die Transkription des Gens *bfrB* (3.1-fach), kodierend für das Eisenspeicherprotein Bacterioferritin B, das durch Bindung von Fe^{2+} und teilweise Oxidation in Fe^{3+} die Zell-schädigende Fenton-Reaktion zu unterbinden vermag (Le Brun *et al.*, 1995).

Die primär dem Energiemetabolismus zugeordneten Gene *ccpR*, kodierend für eine Peroxidase, und PA2664, kodierend für ein Flavohämoprotein, sind zusätzlich für den Schutz der Zelle vor Peroxiden (Ellfolk *et al.*, 1991; Fülöp *et al.*, 1995) bzw. dem Zellgift NO

(Crawford und Goldberg, 1998) zuständig und waren ebenfalls nach einer zweistündigen anaeroben Inkubation induziert. Die Eliminierung von NO durch Flavohämoprotein geschieht entweder aerob durch Oxidierung zu Nitrat bzw. anaerob durch Reduktion zu N₂O (Poole and Hughes, 2000). Die 69.8-fache anaerobe Induktion des Gens PA2664, das somit zu den am stärksten regulierten Genen unter den getesteten Bedingungen gehört, verweist auf die Notwendigkeit der NO-Detoxifikation beim Übergang von aeroben Kulturbedingungen zur NO-produzierenden Nitratatmung. Eine weitere, bisher unbekannte Funktion für PA2664 unter anaeroben Bedingungen ist jedoch nicht ausgeschlossen. Die anaerobe Transkriptionsinduktion von Genen, deren kodierte Proteine Schutz vor Sauerstoff und dessen Metaboliten bieten, ist unter anderem notwendig, um die Aktivität von Sauerstoff-labilen anaeroben Proteinen zu gewährleisten.

Tab.13: Anaerob gegenüber aerob induzierte und reprimierte Gene, als Reaktion auf den Sauerstoffmangel.

PA-Nummer	Gen	anaerob vs. aerob	Protein/ Funktion	PA-Nummer	Gen	anaerob vs. aerob	Protein/ Funktion
Anpassung, Schutz							
PA0425	<i>mexA</i>	2.0	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA precursor	PA0595	<i>ostA</i>	-2.1	organic solvent tolerance protein OstA precursor
PA0962		2.8	probable dna-binding stress protein	PA1159		-7.9	probable cold-shock protein
PA3531	<i>bfrB</i>	3.1	bacterioferritin	PA1432	<i>lasI</i>	-2.7	autoinducer synthesis protein LasI
PA4236	<i>katA</i>	4.3	catalase	PA3818		-3.1	extragenic suppressor protein SuhB
PA0139	<i>ahpC</i>	-2.2	alkyl hydroperoxide reductase	PA4743	<i>rbfA</i>	-2.2	ribosome-binding factor A
PA0456		-2.2	probable cold-shock protein	PA5117	<i>typA</i>	-2.3	regulatory protein TypA
Biosynthese von Kofaktoren und prosthetischen Gruppen							
PA0500	<i>bioB</i>	2.2	biotin synthase	PA0381	<i>thiG</i>	-2.3	thiamine biosynthesis protein, thiazole moiety
PA1546	<i>hemN</i>	17.4	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	PA4053			
PA3812	<i>iscA</i>	3.3	probable iron-binding protein IscA		<i>ribE</i>	-2.2	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
PA3813	<i>iscU</i>	2.8	probable iron-binding protein IscU	PA4569	<i>ispB</i>	-2.2	octaprenyl-diphosphate synthase
PA3814	<i>iscS</i>	3.4	L-cysteine desulfurase (pyridoxal phosphate-dependent)	PA4731	<i>panD</i>	-3.9	aspartate 1-decarboxylase precursor
				PA5118	<i>thiI</i>	-2.5	thiazole biosynthesis protein ThiI
Zellteilung							
PA3245	<i>minE</i>	-2.4	cell division topological specificity factor MinE	PA4481	<i>mreB</i>	-2.4	rod shape-determining protein MreB
Zellwand und LPS							
PA3337	<i>rfaD</i>	30.4	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	PA3646	<i>lpxD</i>	-2.3	UDP-3-O-[3-hydroxy-lauroyl] glucosamine N-acyltransferase
PA1812	<i>mltD</i>	-2.8	membrane-bound lytic murein transglycosylase D precursor	PA4450	<i>murA</i>	-2.2	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
PA3636	<i>kdsA</i>	-2.3	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase				
Chemotaxis							
PA1561	<i>aer</i>	8.3	aerotaxis receptor Aer	PA4309	<i>pctA</i>	4.7	chemotactic transducer PctA
PA2867		3.0	probable chemotaxis transducer	PA4633		4.1	probable chemotaxis transducer
PA3349		2.2	probable chemotaxis protein				
Chaperone und Hitzeschockproteine							
PA3126	<i>ibpA</i>	20.4	heat-shock protein IbpA	PA3262		-2.3	probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type
PA3811	<i>hscB</i>	2.4	heat shock protein HscB				
PA4761	<i>dnaK</i>	2.1	DnaK protein	PA4385	<i>groEL</i>	-2.1	GroEL protein
PA5054	<i>hslU</i>	2.7	heat shock protein HslU	PA4386	<i>groES</i>	-2.3	GroES protein
PA0594	<i>surA</i>	-2.4	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA	PA4558		-2.0	probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type
PA1793	<i>ppiB</i>	-2.0	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B				
PA1800	<i>tig</i>	-5.0	trigger factor	PA4572	<i>fliB</i>	-8.9	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FliB
PA1805	<i>ppiD</i>	-2.0	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D				

Membranproteine							
PA4067	<i>oprG</i>	29.3	Outer membrane protein OprG precursor	PA4757		-5.5	conserved hypothetical protein
PA4370	<i>icmP</i>	-2.6	Insulin-cleaving metalloproteinase outer membrane protein precursor				
Bewegung und Anheftung							
PA0396	<i>pilU</i>	2.5	twitching motility protein PilU	PA5044	<i>pilM</i>	2.5	type 4 fimbrial biogenesis protein PilM
PA1092	<i>flhC</i>	2.5	flagellin type B	PA1078	<i>flgC</i>	-4.8	flagellar basal-body rod protein FlgC
PA5041	<i>pilP</i>	2.7	type 4 fimbrial biogenesis protein PilP	PA1080	<i>flgE</i>	-2.8	flagellar hook protein FlgE
PA5043	<i>pilN</i>	2.5	type 4 fimbrial biogenesis protein PilN				
Proteinsekretion							
PA0768	<i>lepB</i>	-2.5	signal peptidase I	PA4276	<i>secE</i>	-4.6	secretion protein SecE
PA3821	<i>secD</i>	-4.3	secretion protein SecD	PA5128	<i>secB</i>	-3.2	secretion protein SecB
PA4243	<i>secY</i>	-5.4	secretion protein SecY				
Transkriptionsregulatoren							
PA0120		23.0	probable transcriptional regulator	PA3458		6.7	probable transcriptional regulator
PA0424	<i>mexR</i>	4.6	multidrug resistance operon repressor MexR	PA3678		4.1	probable transcriptional regulator
PA0515		21.9	probable transcriptional regulator NtrD	PA3973		23.0	probable transcriptional regulator
PA1754	<i>cysB</i>	2.0	transcriptional regulator CysB	PA4878		5.6	probable transcriptional regulator
PA2259	<i>ptxS</i>	3.4	transcriptional regulator PtxS	PA5499	<i>np20</i>	2.8	transcriptional regulator np20
PA3006	<i>psrA</i>	3.9	transcriptional regulator PsrA	PA1776		-2.4	probable sigma-70 factor, ECF subfamily
Transport kleiner Moleküle							
PA1429		3.8	probable cation-transporting P-type ATPase	PA0958	<i>oprD</i>	-2.1	Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD
PA3038		2.0	probable porin	PA0969	<i>tolQ</i>	-2.8	TolQ protein
PA3692		3.5	probable outer membrane protein precursor	PA0973	<i>oprL</i>	-2.8	Peptidoglycan associated lipoprotein OprL precursor
PA3920		16.9	probable metal transporting P-type ATPase	PA1493	<i>cysP</i>	-2.4	sulfate-binding protein of ABC transporter
PA4206	<i>mexH</i>	8.4	probable RND efflux membrane fusion protein precursor	PA1777	<i>oprF</i>	-2.0	Major porin and structural outer
PA4464	<i>ptsN</i>	2.7	nitrogen regulatory IIA protein	PA2204		-3.0	probable binding protein component of ABC transporter
PA5167		2.8	probable c4-dicarboxylate-binding protein	PA2322		-2.4	gluconate permease
PA5231		4.4	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	PA2760		-3.1	probable outer membrane protein precursor
PA0195	<i>pntA</i>	-3.7	still frameshift pyridine nucleotide transhydrogenase	PA5076		-6.0	probable binding protein component of ABC transporter
PA0283	<i>sbp</i>	-2.6	sulfate-binding protein precursor				

Interessant war auch die 8.3-fache anaerobe Induktion von *aer*, dessen Genprodukt für die Detektion von Sauerstoff in der Umgebung zuständig ist (Nichols und Harwood, 2000). Das von Aer vermittelte Signal wird vermutlich von Chemotaxis-Proteinen an den Bewegungsapparat weitergeleitet. Die Induktion von *aer* und einiger weiterer Chemotaxis-Gene nach zweistündiger anaerober Induktion könnte Ausdruck einer verstärkten Suche nach Sauerstoff in der Umgebung sein.

Die Komplexität des während der Umstellung auf anaerobe Umweltbedingungen aktiven regulatorischen Netzwerkes spiegelt sich wider in der Transkriptionsinduktion von 13 bekannten bzw. hypothetischen Transkriptionsregulatoren, von denen NarL, der Antwortregulator der Nitratsensorkinase NarX, bereits in der Gruppe des Energiemetabolismus aufgeführt wurde. Dementgegen konnte nur ein einzelner unter anaeroben Bedingungen reprimierter Regulator detektiert werden.

3.1.4.4 31 % der unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen regulierten Gene kodieren für hypothetische Proteine unbekannter Funktion

Von Interesse sind auch die in Tab. 14 dargestellten, bisher unbekannten hypothetischen Proteine, deren Transkription unter anaeroben Bedingungen induziert bzw. reprimiert war und die wichtige Funktionen unter den entsprechenden Umweltbedingungen ausüben könnten.

Tab. 14: Angabe von anaerob gegenüber aerob regulierten Genen, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren.

Hypothetische, unbekannte Proteine									
Gen	anaerob vs. aerob	Gen	anaerob vs. aerob	Gen	anaerob vs. aerob	Gen	anaerob vs. aerob	Gen	anaerob vs. aerob
PA0121	3.2	PA2501	10.9	PA3519	14.7	PA5232	8.1	PA1775	-2.0
PA0141	24.7	PA2567	11.5	PA3572	19.4	PA5303	10.2	PA1837	-3.7
PA0200	41.5	PA2604	2.2	PA3614	4.4	PA5306	2.0	PA1852	-2.1
PA0359	3.6	PA2662	38.1	PA3615	4.2	PA5346	3.3	PA2027	-2.6
PA0388	2.3	PA2663	64.0	PA3662	5.1	PA5446	10.0	PA2667	-2.0
PA0505	3.6	PA2707	2.4	PA3691	3.6	PA5475	10.0	PA2950	-2.6
PA0526	2.7	PA2753	26.0	PA3815	2.2	PA5494	5.8	PA2971	-3.1
PA0588	5.6	PA2754	6.2	PA3819	4.8	PA0039	-2.0	PA3722	-2.5
PA0596	2.4	PA2805	2.6	PA3880	4.9	PA0046	-8.1	PA3806	-2.8
PA0665	2.4	PA2868	4.4	PA3919	13.0	PA0083	-3.9	PA3822	-2.8
PA0713	4.4	PA2883	7.1	PA3971	11.5	PA0084	-2.5	PA3988	-2.4
PA1076	3.9	PA3017	2.8	PA4328	16.9	PA0085	-2.5	PA4317	-4.1
PA1324	3.5	PA3040	2.1	PA4348	18.7	PA0094	-2.9	PA4451	-2.8
PA1333	3.7	PA3041	6.4	PA4352	5.3	PA0165	-3.6	PA4453	-2.6
PA1414	38.7	PA3235	10.4	PA4463	3.1	PA0277	-8.9	PA4459	-2.3
PA1550	3.4	PA3278	5.6	PA4535	2.3	PA0284	-4.3	PA4632	-7.0
PA1673	20.4	PA3307	2.8	PA4577	7.3	PA0563	-3.2	PA4673	-5.3
PA1746	44.5	PA3309	69.8	PA4611	14.7	PA0578	-5.9	PA4852	-2.6
PA1789	34.3	PA3351	2.1	PA4657	5.9	PA0937	-4.5	PA4933	-2.0
PA1847	5.6	PA3352	2.3	PA4658	2.7	PA0964	-4.4	PA5130	-4.1
PA2126	10.7	PA3356	5.1	PA5027	7.5	PA1533	-2.6	PA5285	-3.8
PA2127	9.4	PA3385	2.9	PA5208	4.7	PA1574	-3.3	PA5286	-5.0
PA2274	14.7	PA3432	4.4	PA5212	4.0	PA1768	-2.6	PA5568	-4.8
Hypothetische Enzyme									
Gen	anaerob vs. aerob	Protein/Funktion		Gen	anaerob vs. aerob	Protein/Funktion			
PA0506	4.2	probable acyl-CoA dehydrogenase		PA5523	9.0	probable aminotransferase			
PA0779	2.6	probable ATP-dependent protease		PA5546	5.9	conserved hypothetical protein			
PA1742	4.6	probable amidotransferase		PA1127	-2.0	probable oxidoreductase			
PA2119	7.0	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)		PA3001	-3.6	probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase			
PA2298	2.9	probable oxidoreductase		PA3139	-2.0	probable amino acid			
PA3972	9.8	probable acyl-CoA dehydrogenase		PA3803	-2.3	aminotransferase			
PA4198	10.4	probable AMP-binding enzyme				probable isoprenoid biosynthetic protein GcpE			
PA4615	3.0	probable oxidoreductase		PA4431	-5.9	probable iron-sulfur protein			
PA5312	7.2	probable aldehyde dehydrogenase							

3.1.5 Promotoranalysen der zehn unter anaeroben Bedingungen am stärksten induzierten Operons mit Hilfe von Reporterfusionen.

Um zu überprüfen, ob die mittels der Microarrays erhaltenen Transkriptomdaten auch unter Verwendung alternativer Methoden reproduzierbar sind, wurden von den zehn am stärksten unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen induzierten Genen Promotoranalysen mit Hilfe von *lacZ*-Reporterfusionen vorgenommen. Für die Überprüfung der Genexpression der Gene PA0200, PA1557, PA1673, PA1746, PA1789, PA3309, PA3337, PA4067, PA5170 und PA5427 wurden deren potentielle Promotoren mit dem Reportergen *lacZ* des Vektors mini-CTX-*lacZ* fusioniert. Dieser Vektor wird in *P. aeruginosa* über die *attB*-Stelle in dessen Chromosom integriert, wodurch im Gegensatz zum oft verwendeten frei replizierbaren Vektor pQF50 Fehler durch unterschiedliche Kopienzahl in der Zelle verhindert werden. Die Zellen mit den Promotor-*lacZ*-Fusionen wurden aerob bis zu einer $OD_{578} = 0.3$ kultiviert und geerntet, wohingegen für die anaerobe Promotoruntersuchung die Zellen nach acht bzw. 24 Stunden anaeroben Wachstums geerntet wurden. Der für die Microarrays verwendete Versuchsaufbau, aerobes Wachstum bis zu einer $OD_{578} = 0.3$ mit anschließendem Wechsel zu anaeroben Bedingungen und zweistündiger anaerober Inkubation, konnte nicht verwendet werden, da für die Promotoranalyse mittels β -Galaktosidaseaktivitäten die Produktion des Proteins β -Galaktosidase notwendig ist. Aufgrund der im Vergleich zur Transkription langsameren Translation konnte nach einer zweistündigen anaeroben Adaptionsphase keine differentielle β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden, wohingegen unter Verwendung logarithmisch gewachsener anaerober Zellen eine eindeutige anaerobe Induktion detektiert werden konnte (siehe Abb. 18).

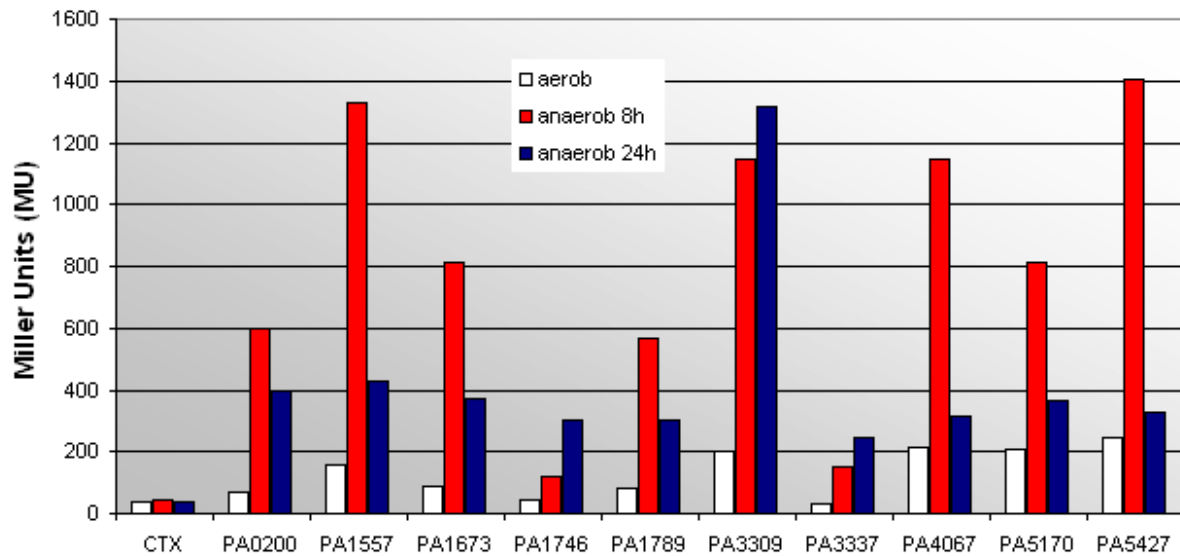


Abb. 18: β -Galaktosidaseaktivitäten in Miller Units von zehn Reportergenfusionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Promotoren der Reportergenfusionen gehören zu Genen der zehn am stärksten induzierten Operons, analysiert durch eine Transkriptomanalyse anaerob gegenüber aerob gewachsener *P. aeruginosa*-Kulturen.

Tab. 15 zeigt einen Vergleich der mittels Reportergenfusionen sowie durch Verwendung von Microarrays erhaltenen Transkriptomdaten von zehn Genen. In allen zehn Fällen ist eine eindeutige anaerobe Induktion erkennbar, wenn auch die mittels der β -Galaktosidaseaktivitäten ermittelten Induktionen im Vergleich zu den mittels Microarrays erhaltenen Daten geringer ausfielen. Dies ist auf die unterschiedlichen Analyse-Systeme zurückzuführen, da unter Verwendung der Microarrays relative Mengen und Änderungen der mRNA detektiert werden, wohingegen im Falle der Reportergenfusionen die gebildeten Transkripte erst in Protein translatiert werden und anschließend die Aktivität der β -Galaktosidase gemessen wird.

Tab. 15: Vergleich der anaeroben Induktion (angegeben in n-fach) von zehn Genen unter Verwendung von β -Galaktosidase-Assays gegenüber Microarrays.

Gen	anaerob (8h) vs aerob		Gen	anaerob (8h) vs aerob	
	Reportergenfusion	Microarray		Reportergenfusion	Microarray
PA0200	9	41.5	PA3309	6.6	69.8
PA1557	8.4	15.7	PA3337 (rfaD)	7.1	30.4
PA1673	9.1	20.4	PA4067 (oprG)	5.4	29.3
PA1746	7	44.5	PA5170 (arcD)	3.9	149.5
PA1789	6.9	34.3	PA5427 (adhA)	5.7	127.9

3.1.6 Das Anr-Dnr-Regulon von *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das sich auch unter anaeroben Umweltbedingungen unter Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren vermehren kann. Wichtigster globaler anaerober Regulator ist Anr, der aufgrund seiner hohen Identität auf Aminosäuresequenzebene mit *E. coli* Fnr, insbesondere der vier konservierten Cysteinreste, vermutlich in seiner aktiven dimeren Form je ein 4Fe4S-Zentrum pro Untereinheit besitzt (Sawers, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 2002). In der Literatur wurden bisher einzelne Gene beschrieben, die unter der Kontrolle von Anr stehen (siehe Kapitel 1.2.4.2), eine globale Analyse des Anr-Regulons wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Anr-Regulon auf Transkriptomebene zu entschlüsseln, wofür die *anr*-Mutante PAO6261 verwendet wurde. Des weiteren ist bekannt, dass Anr das Gen des Transkriptionsregulators Dnr induziert, der wiederum für die anaerobe Expression der Denitrifikationsgene verantwortlich ist und an die gleiche palindromische DNA-Sequenz bindet wie Anr (Arai *et al.*, 1995). Demnach entspricht die *anr*-Mutante einer *anr-dnr*-Doppelmutante, so dass für eine differentielle Aufklärung der Anr- bzw. Dnr-abhängigen Gene zusätzlich das anaerobe Transkriptom der *dnr*-Mutante RM536 analysiert wurde (schematische Darstellung siehe Abb. 19).

In Anlehnung an die Durchführung der Transkriptomanalyse aerob und anaerob gewachsener *P. aeruginosa* Wildtyp Zellen, wurde sowohl die *anr*-Mutante als auch die *dnr*-Mutante aerob bis zu einer $OD_{578} = 0.3$ kultiviert, anschließend in ein anaerobes Kulturgefäß überführt und für zwei Stunden anaerob induziert. Die RNA der anaerob induzierten Zellen wurde für die Hybridisierung mit dem Microarray vorbereitet und die Transkriptomdatensätze untereinander sowie mit den Datensätzen anaerob induzierter *P. aeruginosa* Wildtyp Zellen verglichen.

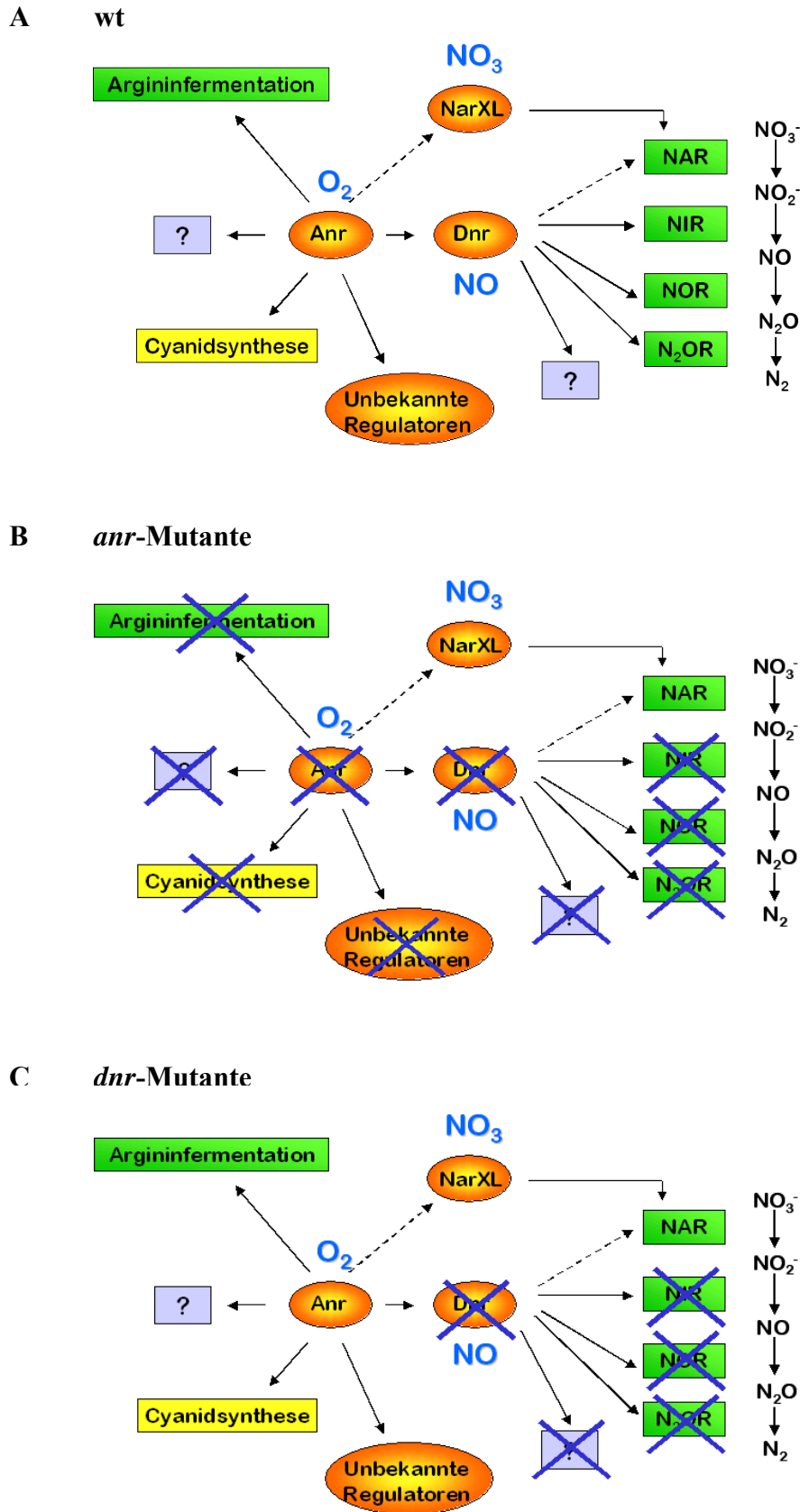


Abb. 19: Darstellung des Anr-Dnr-Regulons mit bekannten und unbekannten Zielgenen im PAO1-Wildtyp (A), die in einer *anr*-Mutante (B) bzw. *dnr*-Mutante (C) nicht exprimiert werden.

3.1.6.1 Unter anaeroben Bedingungen wurden 57 Gene durch Anr und 9 Gene durch Dnr induziert

Insgesamt waren in der *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen 66 Gene gegenüber dem Wildtyp deutlich geringer exprimiert (Tab. 16), von denen durch einen Vergleich mit den Transkriptomdaten der *dnr*-Mutante neun als Dnr-abhängig identifiziert werden konnten.

Eine Dnr-Abhängigkeit mit Nachweis einer Dnr-Bindestelle ist bereits für die Expression der Denitrifikationsgene *nirS*, kodierend für die Nitritreduktase, und *norBC*, kodierend für die NO-Reduktase, beschrieben worden (Arai *et al.*, 1995). Unter Berücksichtigung der Operon-Struktur von *nirSMC*, wobei NirM und NirC die Elektronendonoren von NirS darstellen, sowie der Zugehörigkeit des potentiellen Regulators PA0515 zum *nirS*-Cluster, konnten drei neue Dnr-abhängige Gene, PA3038, PA3519 und PA4206, detektiert werden. PA3038 kodiert für ein hypothetisches Porin, PA3519 für ein hypothetisches Protein, und PA4206, kodiert für das hypothetische RND-Efflux-Membranfusions-Protein MexH. Eine Dnr-Bindestelle innerhalb der potentiellen Promotoren konnte jedoch unter Verwendung einer *weight matrix* Analyse, durchgeführt von R. Münch in unserem Labor, nicht detektiert werden, so dass es sich hier vermutlich um eine indirekte Regulation handelt.

Tab. 16: Anr- bzw. Dnr-abhängige Gene, deren Transkription unter anaeroben Bedingungen in der *anr*-Mutante gegenüber Wildtyp-Zellen deutlich geringer war. Zu den Anr-Bindesequenzen sind die zugehörigen Scores angegeben, die den Grad der Konservierung der Anr-Boxen anzeigen.

PA-Nummer	Gen	Anr-Box	Score	Bp vom Startcodon	<i>anr</i> -Mutante vs. Wildtyp	Regulator	Protein/ Funktion
PA0141		TTGACCCCCATCAA	14.57	249	-6.6	Anr	conserved hypothetical protein
PA0200		TTGCGCTGGATCAA	13.39	90	-18.1	Anr	hypothetical protein
PA0459					-7.7	Anr	probable ClpA/B protease ATP binding subunit
PA0506					-2.7	Anr	probable acyl-CoA dehydrogenase
PA0515					-2.4	Dnr	probable transcriptional regulator
PA0517	<i>nirC</i>				-3.0	Dnr	probable c-type cytochrome precursor
PA0518	<i>nirM</i>				-3.5	Dnr	cytochrome c-551 precursor
PA0519	<i>nirS</i>	TTGACCGGAATCAA	14.46	124	-5.1	Dnr	nitrite reductase precursor
PA0523	<i>norC</i>	TTGATTGCCATCAA	14.74	58	-18.4	Dnr	nitric-oxide reductase subunit C
PA0524	<i>norB</i>				-36.1	Dnr	nitric-oxide reductase subunit B
PA0835	<i>pta</i>				-3.5	Anr	phosphate acetyltransferase
PA0836		CTGATGAAAATCAA	13.62	183	-2.3	Anr	probable acetate kinase
PA0962		TTGGTCTATGTCAA	13.46	85	-2.1	Anr	probable dna-binding stress protein
PA1076					-4.4	Anr	hypothetical protein
PA1414					-5.5	Anr	hypothetical protein
PA1546	<i>hemN</i>	TTGATTGTATCAA	14.96	64	-45.3	Anr	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
PA1555					-9.4	Anr	probable cytochrome c
PA1556					-23.8	Anr	probable cytochrome c oxidase subunit
PA1557		TTGATCGGGATCAA	14.76	135	-32.6	Anr	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)
PA1561	<i>aer</i>	TTGACCTCCATCAG	13.45	152	-4.8	Anr	aerotaxis receptor Aer
PA1673		TTGATCGGCGTCAA	14.35	81	-17.1	Anr	hypothetical protein
PA1746		TTGATACGCATCAA	14.86	84	-10.9	Anr	hypothetical protein
PA1789		TTGATGCATATCAA	14.85	66	-11.3	Anr	hypothetical protein
PA1847					-3.2	Anr	conserved hypothetical protein

PA-Nummer	Gen	Anr-Box	Score	Bp vom Startcodon	anr-Mutante vs. Wildtyp	Regulator	Protein/ Funktion
PA2119		TTGATATGGGTCAT	13.18	94	-5.9	Anr	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)
PA2127					-4.5	Anr	conserved hypothetical protein
PA2501		TTGATATTTATCAG	13.66	67	-2.5	Anr	hypothetical protein
PA2662					-4.5	Anr	conserved hypothetical protein
PA2663					-7.9	Anr	hypothetical protein
PA2664	<i>flp</i>				-4.8	Anr	flavohemoprotein
PA2753					-6.5	Anr	hypothetical protein
PA2754					-5.6	Anr	conserved hypothetical protein
PA3038					-2.1	Dnr	probable porin
PA3278					-2.8	Anr	hypothetical protein
PA3309		TTGCCGGAGGTCAA	13.03	86	-26.4	Anr	conserved hypothetical protein
PA3337	<i>rfaD</i>	TTGTTGCAGGTCAA	13.49	54	-23.4	Anr	ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase
PA3519					-4.1	Dnr	hypothetical protein
PA3572					-6.8	Anr	hypothetical protein
PA3614		CTGACCTGCATCAA	13.67	110	-2.3	Anr	hypothetical protein
PA3691					-2.1	Anr	hypothetical protein
PA3811	<i>hscB</i>				-5.8	Anr	heat shock protein HscB
PA3812	<i>iscA</i>				-9.4	Anr	probable iron-binding protein IscA
PA3813	<i>iscU</i>				-8.1	Anr	probable iron-binding protein IscU
PA3814	<i>iscS</i>				-10.7	Anr	L-cysteine desulfurase (pyridoxal phosphate-dependent)
PA3815					-4.3	Anr	conserved hypothetical protein
PA3879	<i>narL</i>	TTGATTCTATCAA	14.81	99	-4.2	Anr	two-component response regulator NarL
PA3880		TTGATTCCGGTCAA	14.44	58	-2.4	Anr	conserved hypothetical protein
PA4067	<i>oprG</i>	TTGAGCTGTGTCAA	14.01	71	-19.0	Dnr	Outer membrane protein OprG precursor
PA4206					-2.4	Dnr	probable RND efflux membrane fusion protein precursor
PA4328		CTGACCCAGATCAA	13.56	60	-4.7	Anr	hypothetical protein
PA4348					-8.7	Anr	conserved hypothetical protein
PA4352		TTGATGTGCATCAA	14.99	67	-5.8	Anr	conserved hypothetical protein
PA4366	<i>sodB</i>				-2.0	Anr	superoxide dismutase
PA4577		CTGACGCCGGTCAA	13.12	96	-3.4	Anr	hypothetical protein
PA4611					-3.2	Anr	hypothetical protein
PA4922	<i>azu</i>	TTGACCTGAATCAG	13.44	73	-3.3	Anr	azurin precursor
PA5027					-5.4	Anr	hypothetical protein
PA5051	<i>argS</i>	CTGACCCCAGTCAA	13.10	211	-3.5	Anr	arginyl-tRNA synthetase
PA5170	<i>arcD</i>	TTGACGTGGATCAG	13.46	65	-34.9	Anr	arginine/ornithine antiporter
PA5171	<i>arcA</i>				-28.3	Anr	arginine deiminase
PA5172	<i>arcB</i>				-28.3	Anr	ornithine carbamoyltransferase, catabolic
PA5173	<i>arcC</i>				-6.4	Anr	carbamate kinase
PA5208					-2.4	Anr	conserved hypothetical protein
PA5232		TTGATGCACGTCAG	13.22	111	-5.4	Anr	conserved hypothetical protein
PA5427	<i>adhA</i>				-25.1	Anr	alcohol dehydrogenase
PA5475		TTGATCGACATCAA	14.78	76	-9.7	Anr	hypothetical protein

3.1.6.2 Identifizierung von Anr-Bindesequenzen in potentiellen Promotorregionen Anr/Dnr-regulierter Gene

Ein erstes Modell der verwendeten *position weight matrix* wurde anhand der 12 in der Literatur beschriebenen DNA-Bindesequenzen unter Beachtung ihrer Transkriptionsrichtung mit Hilfe des *information theory position weight matrix model* (Schneider *et al.*, 1986) erstellt (Münch *et al.*, 2003). Mit dieser vorläufigen *weight matrix* wurden Promotorregionen von Genen, die mittels der hier diskutierten Transkriptomdaten sowie von Dr. N. Quäck erstellten Proteomdaten als Anr-kontrolliert detektiert wurden, *in silico* auf potentielle Anr-Bindestellen untersucht. 25 der erhaltenen Anr-Bindesequenzen in Promotorregionen von Genen, deren anaerobe Induktion stark Anr-abhängig war, wurden in das *information theory position weight matrix model* aufgenommen, dem somit 37 experimentell bestätigte Anr-Boxen zugrunde

lagen. Das mit diesem Modell erhaltene Sequenz-Logo (Schneider und Stephens, 1990) ist in Abb. 20 dargestellt. Deutlich erkennbar ist eine kosinuswellenförmige Sequenzkonservierung der Basen an den Positionen 2, 3, 12 und 13. Sowohl der Abstand von 10 Basenpaaren sowie der Informationsgehalt von zwei Bits korrelieren gut mit einer Interaktion des dimeren Anr-Proteins mit der großen Furche der DNA (Schneider, 1996). Die vier bisher als unspezifisch beschriebenen Nukleotide in der Mitte der Palindromsequenz beinhalten dem Sequenz-Logo zufolge zusätzliche Informationen der Anr-DNA-Bindung, da in keiner der 37 untersuchten Anr-Bindesequenzen die Nukleotidfolge AT an den Positionen 7 und 8 enthalten war. Dieser zwischen den beiden Palindromen gelegene Teil der Anr-Box ist vermutlich Teil der kleinen Furche, mit der der Regulator interagiert. Eine solche Interaktion wurde bereits für *E. coli* Fnr beschrieben (Scott *et al.*, 2003). Diese erweiterte *position weight matrix* wurde für eine Analyse des Gesamtgenoms von *P. aeruginosa* verwendet, wodurch 89 potentielle Anr-Bindesequenzen in Promotorregionen ermittelt wurden.

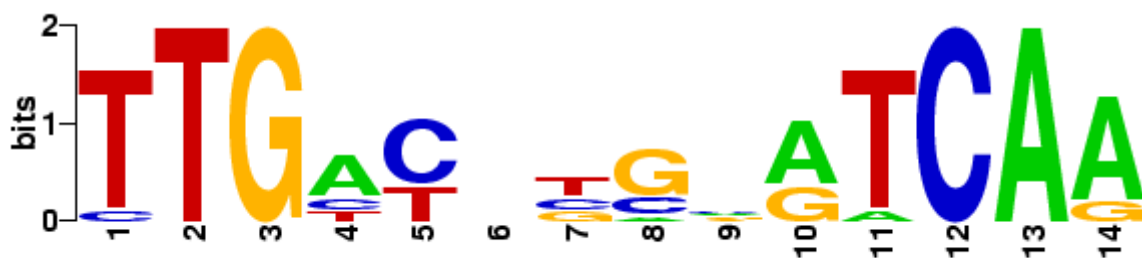


Abb. 20: *Weight Matrix* der Anr-Bindestelle in *P. aeruginosa*.

Von den 66 Anr/Dnr-abhängigen Genen besaßen 28 eine potentielle Anr-Bindestelle in ihren Promotorregionen. Unter diesen befanden sich die bereits in der Literatur beschriebenen Anr-abhängigen Gene *arcDABC*, kodierend für Proteine der Argininfermentation (Zannoni, 1989; Galimand *et al.*, 1991), *cbb₃-2* (PA1555-1557), kodierend für eine Endoxidase des Typs *cbb₃* (Comolli und Donohue, 2004), und *azu*, kodierend für das blaue Kupferprotein Azurin (Vijgenboom, 1997). Für die anaerobe Transkriptionsinduktion des Operons *narXL*, kodierend für das Nitratsensorsystem NarXL, sowie für *hemN*, kodierend für die Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase der Häm-Biosynthese, wurde eine Abhängigkeit von Anr und Dnr beschrieben, ohne eindeutige Zuordnung der Induktion zu einem der zwei Regulatoren (Krieger, 2001; Rompf *et al.*, 1998). Die mit Hilfe der Microarrays erhaltenen Transkriptomdaten verweisen auf eine reine Anr-Abhängigkeit sowohl des *narXL*-Operons als auch von *hemN*.

Neu identifizierte Mitglieder des Anr-Regulons mit einer potentiellen Anr-Bindestelle waren das Gen *oprG*, kodierend für ein Protein der äußeren Membran, das Gen *aer* (PA1561), kodierend für den Aerotaxisrezeptor Aer, sowie das Operon PA0836-PA0835, dessen Gene für die Acetatkinase AckA und die Phosphotransacetylase Pta kodieren, beides Proteine, die für das anaerobe Langzeitüberleben mittels Pyruvatfermentation benötigt werden (Eschbach *et al.*, 2004).

Ebenfalls Anr-abhängig waren zwei Alkoholdehydrogenasen, von denen der Promotor von PA2119 im Gegensatz zu PA5427 eine Anr-Bindesequenz aufweist. Des weiteren mit einer Anr-Bindesequenz versehen waren die Gene *rfaD*, kodierend für ein an der LPS-Biosynthese beteiligtes Protein (Drazek *et al.*, 1995), *argS*, kodierend für die Arginyl-tRNA-Synthetase und *pvdS*, das für eine Polyphosphat-Kinase kodiert. Vier von fünf Genen (PA1789, PA3309, PA4328, PA4352 gegenüber PA5027), deren Genprodukte eine USP-Domänenstruktur aufweisen und demnach potentielle Stressproteine darstellen (Kvint *et al.*, 2003), besaßen ebenfalls eine Anr-Bindestelle in ihrer Promotorregion. Von Interesse sind vor allem auch die zehn Anr-abhängigen Gene, die für hypothetische Proteine kodieren und eine potentielle Anr-Bindesequenz im Promotorbereich besitzen, von denen PA0962 für ein potentielles DNA-Bindeprotein kodiert.

Unter den aufgrund fehlender Anr-Bindesequenzen in den Promotorenbereichen indirekt Anr-abhängigen Gene befindet sich *fhp*, kodierend für ein Flavohämoprotein, das vermutlich für den Schutz der Zelle vor NO zuständig ist, sowie PA0459, das für eine Protease des Typs ClpA/B kodiert.

3.1.6.3 Unter anaeroben Bedingungen stehen 13 Gene unter der negativen Kontrolle der beiden Transkriptionsregulatoren Anr und Dnr

Des weiteren gab es 13 Gene, die in der *anr*-Mutante unter anaeroben Bedingungen stärker exprimiert wurden als im Wildtyp (Tab. 17), so dass deren Transkription durch Anr oder Dnr reprimiert zu sein scheint. Die Transkription sechs dieser Gene war in der *dnr*-Mutante, die ein funktionierendes Anr-Protein besitzt, gegenüber der *anr*-Mutante reprimiert, so dass diese Gene unter der Kontrolle von Anr stehen. Zu diesen gehören die vier Gene PA0160, PA0874, PA1829 und PA2820, kodierend für hypothetische Proteine, PA0839, kodierend für einen potentiellen Transkriptionsregulator und PA2550, kodierend für eine hypothetische Acyl-CoA-Dehydrogenase.

Fünf der in der *anr*-Mutante gegenüber dem Wildtyp unter anaeroben Bedingungen induzierten Gene konnten durch die vergleichende Transkriptomanalyse der *anr*- und *dnr*-Mutante keinem der beiden Regulatoren eindeutig zugeordnet werden. Alle fünf Gene kodieren für unbekannte hypothetische Proteine.

Zwei weitere Gene, deren Transkripte in der *anr*-Mutante gegenüber dem Wildtyp unter anaeroben Bedingungen induziert waren, waren dies in gleichem Maße in der *dnr*-Mutante ohne detektierbare Transkriptionsunterschiede zwischen der *anr*- und *dnr*-Mutante. Die Transkription dieser beiden Gene PA2027, kodierend für ein hypothetisches Protein, sowie PA3524, kodierend für die Lactoylglutathion-Lyase GloA1, wird demnach eindeutig durch Dnr reprimiert.

Für alle diese Gene konnte weder im Promotorbereich noch im Gen selbst eine Anr-Bindestelle detektiert werden. Die Transkriptionsreprimierung dieser Gene durch Anr bzw. Dnr ist somit vermutlich indirekter Art.

Tab. 17: Gene, deren Transkription unter Verwendung einer *anr*-Mutante gegenüber des *P. aeruginosa* Wildtyps unter anaeroben Bedingungen induziert waren.

PA-Nummer	Gen	<i>anr</i> -Mutante vs. Wildtyp	<i>dnr</i> -Mutante vs. <i>anr</i> -Mutante	Regulator	Protein/ Funktion
PA0160		4.2	-4.4	Anr	hypothetical protein
PA0839		3.1	-4.5	Anr	probable transcriptional regulator
PA0874		3.4	-7.6	Anr	hypothetical protein
PA1829		2.9	-2.0	Anr	hypothetical protein
PA2550		3.7	-3.9	Anr	probable acyl-CoA dehydrogenase
PA2820		4.0	-2.3	Anr	hypothetical protein
PA2946		2.4	-1.7	Anr/Dnr	hypothetical protein
PA3017		2.2	-1.7	Anr/Dnr	conserved hypothetical protein
PA4523		2.4	-1.4	Anr/Dnr	hypothetical protein
PA4917		5.2	-1.4	Anr/Dnr	hypothetical protein
PA5446		2.8	-1.5	Anr/Dnr	hypothetical protein
PA2027		2.6	-	Dnr	hypothetical protein
PA3524	<i>gloA1</i>	2.0	-	Dnr	lactoylglutathione lyase

3.1.6.4 Weitere potentielle Anr-abhängige Gene

Möglicherweise von Interesse ist eine letzte Gruppe an Genen (35), deren Transkripte in der *anr*-Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht eindeutig reprimiert waren (Reprimierung unterhalb des Grenzwertes von 2 bzw. mindestens zweimal *not changed* beim 4-fach-Vergleich), in der *dnr*-Mutante gegenüber der *anr*-Mutante jedoch eine eindeutige Induktion detektiert werden konnte (Tab. 18).

Tab. 18: Potentielle Anr-abhängige Gene, deren Transkription in der *dnr*-Mutante gegenüber der *anr*-Mutante induziert waren, in der *anr*-Mutante gegenüber dem *P. aeruginosa* Wildtyp jedoch nicht eindeutig reprimiert waren.

PA-Nummer	Gen	Anr-Box	<i>anr</i> -Mutante vs. Wildtyp	<i>dnr</i> -Mutante vs. <i>anr</i> -Mutante	Protein/ Funktion
PA0120			-1.7	2.4	probable transcriptional regulator
PA0392			-1.3	2.4	conserved hypothetical protein
PA0425	<i>mexA</i>		-1.5	2.4	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA precursor
PA0665			-1.7	2.1	conserved hypothetical protein
PA1011			-1.6	2.0	hypothetical protein
PA1049	<i>pdxH</i>	TTGTCCCGGATCAA	-3.2	5.7	pyridoxine 5'-phosphate oxidase
PA1323			-1.5	2.5	hypothetical protein
PA1324			-1.6	2.6	hypothetical protein
PA1429		TTGACCTGTCTCAA	-2.3	2.7	probable cation-transporting P-type ATPase
PA1582	<i>sdhD</i>		-1.2	2.1	succinate dehydrogenase (D subunit)
PA2126			-2.9	4.9	conserved hypothetical protein
PA2634			-2.2	2.8	probable isocitrate lyase
PA2639	<i>nuoD</i>		-3.3	2.7	NADH dehydrogenase I chain C,D
PA2805			-1.7	2.7	hypothetical protein
PA2951	<i>etfA</i>		-1.8	2.4	electron transfer flavoprotein alpha-subunit
PA3011	<i>topA</i>		-1.4	2.3	DNA topoisomerase I
PA3013	<i>foaB</i>		-1.6	2.1	fatty-acid oxidation complex beta-subunit
PA3014	<i>foaA</i>		-4.4	2.7	fatty-acid oxidation complex alpha-subunit
PA3397	<i>fir</i>		-5.2	6.2	ferredoxin--NADP+ reductase
PA3584	<i>glpD</i>		-1.3	2.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
PA3692			-1.9	3.4	probable outer membrane protein precursor
PA3809	<i>fdx2</i>		-3.1	2.8	ferredoxin [2Fe-2S]
PA4235	<i>bfrA</i>	CTGATCCGGGTCAA	-2.3	3.6	bacterioferritin
PA4236	<i>kafA</i>		-3.2	3.9	catalase
PA4265	<i>tufA</i>		-1.8	2.0	elongation factor Tu
PA4385	<i>groEL</i>		-1.2	2.3	GroEL protein
PA4587	<i>ccpR</i>	TTGACGTGGATCAA	-8.3	11.7	cytochrome c551 peroxidase precursor
PA4610		TTGATTCCGATCAG	-3.2	4.9	hypothetical protein
PA4739			-2.0	2.2	conserved hypothetical protein
PA4761	<i>dnaK</i>		-1.6	2.7	DnaK protein
PA4880			-1.3	2.0	probable bacterioferritin
PA4971			-1.1	2.4	adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase
PA5009	<i>waaP</i>		-1.7	2.1	lipopolysaccharide kinase WaaP
PA5010	<i>waaG</i>		-1.3	2.1	UDP-glucose (heptosyl) LPS alpha 1,3-glucosyltransferase WaaG
PA5230			-3.1	4.4	probable permease of ABC transporter
PA5231			-2.9	3.4	probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter
PA5312			-1.5	2.9	probable aldehyde dehydrogenase

Für diese Gene wäre eine Regulation durch Anr denkbar, zumal fünf dieser 35 Gene eine hypothetische Anr-Bindesequenz in ihrem Promotorbereich besaßen, darunter *pdxH*, kodierend für eine Pyridoxin 5'-Phosphat-Oxidase, PA1429, kodierend für eine hypothetische Kationen-transportierende ATPase, sowie PA4610, kodierend für ein unbekanntes hypothetisches Protein. Des weiteren gehört zu diesen fünf Genen *bfrA*, kodierend für das Bakterioferritin A, das ebenso wie das zweite in *P. aeruginosa* vorkommende Bakterioferritin BfrB für den Eisenhaushalt der Zelle notwendig ist. Zusätzlich ist BfrA vermutlich für die Versorgung der Katalase A mit Eisen zuständig (Ma *et al.*, 1999), dessen zugehöriges Gen ebenfalls in der *dnr*-Mutante gegenüber der *anr*-Mutante verstärkt transkribiert wurde, jedoch

keine hypothetische Anr-Bindesequenz im Promotorbereich aufweist. Das fünfte Gen dieser Gruppe ist *ccpR*, kodierend für eine Peroxidase, die gemeinsam mit KatA sowie den beiden Bakterioferritinen die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Eine anaerobe Anr-abhängige Transkriptionsinduktion dieser Gene könnte die Notwendigkeit des Schutzes Sauerstofflabiler Proteine anzeigen.

3.2 Charakterisierung anaerob induzierter potentieller regulatorischer Gene

Die vergleichende Transkriptomanalyse aerob gewachsener und anaerob induzierter *Pseudomonas aeruginosa* Kulturen ergab unter alleiniger Berücksichtigung der mindestens zweifachen Induktion 30 potentielle anaerob induzierte Regulatoren. Von diesen Regulatoren wurden 16 weiter charakterisiert. Dies waren unbekannte hypothetische Regulatoren, die entweder aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Regulatoren aus anderen Organismen, aufgrund der hohen Signalintensität in Affymetrix GeneChips und somit ihrer hohen Transkriptstärke unter anaeroben Bedingungen oder aufgrund der Lokalisation der entsprechenden Gene in Nachbarschaft zu anaerob induzierten Genen des Energiestoffwechsels von Interesse zu sein schienen.

Tab. 19: Anaerob induzierte potentielle Regulatorgene mit Angabe vorhandener Domänenstrukturen sowie Ähnlichkeiten zu anderen bakteriellen Regulatoren.

Gen	anaerob vs. aerob	<i>anr</i> vs. Wildtyp	<i>dnr</i> vs. <i>anr</i>	Domäne	Ähnlichkeiten zu bakteriellen Regulatoren
PA0120	23.0	-1.7	2.4	GntR-domain and 3'-exonuclease domain	45% similar to putative transcriptional regulator LldR [<i>E. coli</i>]
PA0179	2.5	1.2	-1.1	response regulator receiver domain	69% similar to chemotaxis response regulator [R. sphaeroides]; 61% similar to cheY peptide [E. coli]
PA0839	7.6	3.1	-4.5	TetR-domain	near <i>ackA-pfa</i> operon
PA2100	6.0	1.5	-1.2	GntR-domain and aminotransferase domain	
PA2834	2.5	-1.3	-2.2	LysR-like HTH-domain, LysR substrate binding domain	
PA2885	2.7	1.2	-2.3	TetR-domain	50% similar to hypothetical protein Rv3557c [M. tuberculosis]
PA3094	3.7	1.4	1.3	AraC-domain	80% similar to putative virulence regulator [P. alcaligenes]
PA3341	2.5	1.1	-1.6	MarR-domain	62% similar to transcriptional regulator SlyA [S. typhimurium]
PA3458	6.7	-0.5	1.5	MarR-domain	48% similar to transcriptional regulator YkoM [B. subtilis]
PA3678	4.1	-0.8	-1.5	TetR-domain	
PA3757	7.5	-0.9	-1.2	GntR-domain	55% similar to putative transcriptional regulator YvoA [B. subtilis]
PA3973	23.0	1.1	-2.2	TetR-domain	45% similar to hypothetical protein Rv3557c [M. tuberculosis]
PA4112	2.3	-0.3	1.0	PAS, PAC, response regulator receiver, ATP-binding region (ATPase-like), Histidin kinase, bacterial sensor protein, CHASE, Hpt	52% similar to sensory transduction histidine kinase of [Synechocystis sp.]
PA4878	5.6	-0.6	-1.3	MerR-domain, AraC effector binding domain	47% similar to a region of multi-drug efflux transporter regulator TipA [Str. lividans]
PA4983	3.7	1.0	-2.5	response regulator receiver domain	63% similar to DmsR [Rhodobacter sphaeroides]
PA5085	3.6	1.1	-1.5	LysR-like HTH-domain, LysR substrate binding domain	47% similar to regulatory protein LysR [E. coli]

Regulatoren werden im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen von der Zelle oft nur in geringer Menge gebildet, so dass auch Gene in diese Gruppe aufgenommen wurden, deren

Transkriptstärke unter anaeroben Bedingungen geringer als 40 war. Vier dieser hypothetischen Regulatoren (PA0839, PA3757, PA4878 und PA5085) wurden von Dana Heldt in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht (Dana Heldt, Diplomarbeit 2003), während die restlichen potentiellen Regulatoren in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden (Tab. 19).

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von Insertionsmutanten 16 anaerob induzierter potentieller regulatorischer Gene

Von diesen 16 hypothetischen Transkriptionsregulatoren wurden Insertionsmutanten (*single cross over*-Mutanten) hergestellt, indem eine Gentamycin-Resistenzkassette in den regulatorischen Locus insertiert wurde. Eine Überprüfung auf die Insertion der Gentamycin-Kassette an der richtigen Position des Gens wurde mittels Southern Blotting durchgeführt. Diese Mutanten wurden auf ihr anaerobes Wachstumsverhalten auf verschiedenen festen Medien als auch in Flüssigkultur mit Minimalmedium und Glucose als Kohlenstoffquelle getestet. Alle Medien enthielten Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor, bis auf den Test der Argininfermentation. Um eine spontane Rückmutation der Mutanten zum PAO1-Wildtyp zu unterdrücken, wurde die Kultivierung in Gegenwart von Gentamycin durchgeführt. Als Referenzstamm wurde MS1 gewählt, der eine Gentamycin-Resistenzkassette anstelle des Gens *pcs* trägt, welches für die Phosphatidylcholinsynthase kodiert. Diese Mutante besaß keinen anaeroben Wachstumsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp unter den getesteten Bedingungen.

Folgende feste Medien wurden zur Charakterisierung der Mutanten verwendet: LB, PIA (*Pseudomonas isolation agar*), AB-Minimalmedium mit entweder Glucose (20 mM), Succinat, Pyruvat, Alanin (40 mM) oder Casaminosäuren. Des weiteren wurde AB-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle unter Eisenmangelbedingungen verwendet sowie AB-Minimalmedium mit Casaminosäuren, ohne Zusatz von Ammonium als Stickstoffquelle. Für alle bisher genannten Medien wurde 50 mM Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor zugegeben. Für den Test auf Argininfermentation wurde das halbdefinierte OS-Medium verwendet unter Zusatz von 30 mM Arginin. Allen Medien wurde 100 µg/ml Gentamycin als Selektionsmarker zugegeben. Wachstumsanalysen der Mutanten im Vergleich zur MS1-Mutante ergaben unter keiner der genannten Bedingungen signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten, Koloniegröße oder Koloniemorphologie.

Um potentielle Wachstumsphänotypen in Flüssigmedium zu detektieren, wurden Wachstumskurven der Mutanten unter denitrifizierenden Bedingungen in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gegenüber MS1 als Referenzstamm aufgenommen. Unter diesen Bedingungen zeigte einzig die Mutante DHpa3757 signifikant reduziertes Wachstum gegenüber dem Referenzstamm. In der Stationärphase erreichte DHpa3757 nur eine maximale optische Dichte von $OD_{578} = 0.8$ gegenüber einer $OD_{578} = 1.98$ des Referenzstammes (Dana Heldt, Diplomarbeit 2003).

3.2.2 Proteomanalyse der Regulatormutante DHpa3757

Zur weiteren Charakterisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Proteomanalyse der Stämme DHpa3757 und MS1 durchgeführt. Hierfür wurden die *P. aeruginosa* Stämme MS1 und DHpa3757 unter anaeroben Bedingungen in Minimalmedium mit 20 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und 50 mM Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor unter Zugabe von Gentamycin bei 37°C und 100 rpm kultiviert und bei einer OD_{578} von 0.35 geerntet. Die Erstbestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels dem BCA-Test. Nach der Proteinfällung wurde die exakte Proteinkonzentration unter Verwendung des PlusOne 2D Quant-Kits bestimmt. In der folgenden isoelektrischen Fokussierung wurden 500 µg Protein pro pH-Gradientenstreifen (Ready StripTM, pH 5-8, BioRad, München) eingesetzt. Die fokussierten Proteine wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach der zwei-dimensionalen SDS-PAGE wurden die Gele gefärbt, gescannt und unter Verwendung der Software Z3 von Compugen, Tel Aviv, Israel, ausgewertet.

Für die Analyse wurden je drei Gele eines Zustandes zu einem Mastergel vereinigt und die resultierenden Mastergele miteinander verglichen. Abb. 21 zeigt den Vergleich der Mastergele, wobei grüne Spots die in dem Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 hochregulierten Proteine anzeigen, rote Spots die in dem Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 runterregulierten Proteine anzeigen und schwarze Spots Proteine anzeigen, die in beiden Stämmen in gleicher Menge gebildet wurden. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch MALDI-TOF Massenspektrometrie. In Tab. 20 sind die differentiell regulierten Proteine mit ihrer (potentiellen) Funktion sowie unter Angabe ihrer Regulation aufgeführt.

Die RE-Werte (*relative expression*) wurden anhand von korrespondierenden Regionen der zwei Mastergele berechnet und sind ein Maß für die Menge des gebildeten Proteins in dem jeweils verwendeten Stamm. Unterschiede in der Mengenproduktion eines Proteins in den

beiden verwendeten Stämmen werden durch den Induktions-Wert angegeben. Positive Werte > 2 entsprechen einer verstärkten Proteinkonzentration im Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1, negative Werte < -2 hingegen einer reduzierten Proteinkonzentration im Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1. Wenn mehrere Spots des gleichen Proteins ermittelt wurden, wurde in Tab. 20 der Induktionswert des am stärksten regulierten Spots angegeben.

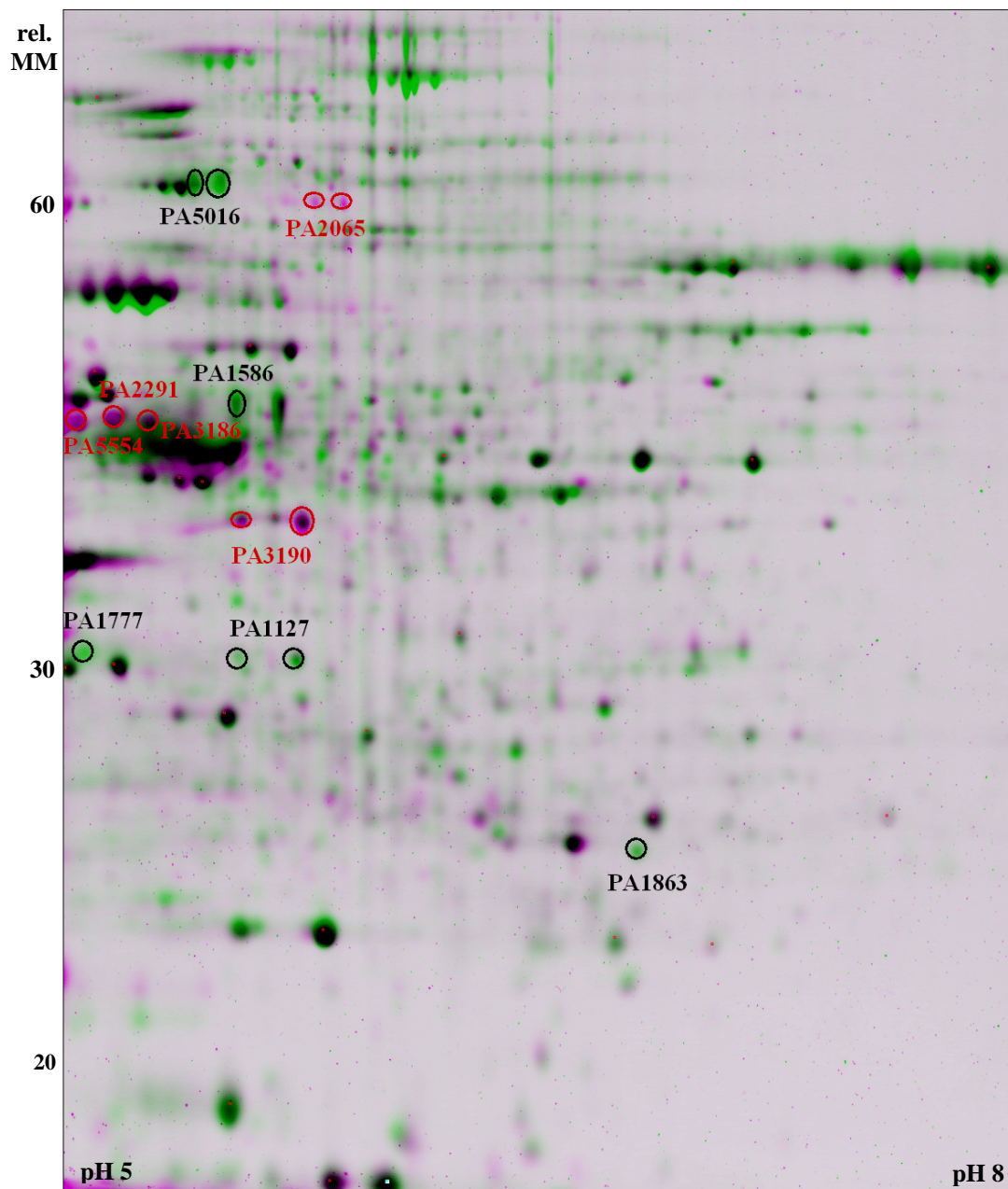


Abb. 21: Das differentielle Proteom der anaerob kultivierten *P. aeruginosa*-Stämme MS1 und DHpa3757. Die Bakterien-Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit 20 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und 50 mM Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese, die Auswertung unter Verwendung der Software Z3 (Compugen). Grüne Spots zeigen die in dem Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 hochregulierten Proteine an, rote Spots die in dem Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 runterregulierten Proteine, und schwarze Spots markieren nicht-regulierte Proteine.

Tab. 20: Im Stamm DHpa3757 gegenüber dem Stamm MS1 regulierte Proteine. Die Proteine der beiden Stämme wurden mittels zwei-dimensionaler SDS-PAGE getrennt, die Regulation über die Software Z3 (Compugen) ausgewertet und die gelisteten Proteine mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Die RE-Werte sind ein Maß für die Menge des gebildeten Proteins in dem Stamm MS1 (RE1) und DHpa3757 (RE2). Die Unterschiede in der Proteinkonzentrationen von DHpa3757 vs. MS1 sind durch den Induktions-Wert angegeben.

Gen		Protein/ Funktion	RE1	RE2	Induktion
PA5016	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	1079	6664	6.2
PA1777	<i>oprF</i>	outer membrane porin OprF precursor	241	1309	5.4
PA1863	<i>modA</i>	molybdate-binding periplasmic protein precursor ModA	378	1932	5.1
PA1127		probable oxidoreductase	264	1251	4.7
PA1586	<i>sucB</i>	dihydrolipoamide succinyltransferase (E2 subunit)	998	2745	2.8
PA2291		probable glucose-sensitive porin	3491	1631	-2.1
PA3190		probable binding protein component of ABC sugar transporter	4237	842	-5.0
PA3186	<i>oprB</i>	Glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB precursor	1949	334	-5.8
PA2065	<i>pcoA</i>	copper resistance protein A precursor	1463	10	-146.3
PA5554	<i>atpD</i>	ATP synthase beta chain	5324	26	-204.8

Das Gen PA3757 kodiert für einen potentiellen Regulator mit einer GntR-Domäne, die nach GntR, dem Repressor des Gluconat-Operons in *Bacillus subtilis* benannt wurde (Fujita und Fujita, 1987; Haydon und Guest, 1991). Das *helix-turn-helix* (HTH)-Motif der GntR-Domäne ermöglicht dem Protein die Bindung an DNA, wodurch es seine transkriptionsregulatorische Fähigkeit erhält.

Die in der Mutante DHpa3757 gegenüber MS1 vermindert produzierten Proteine sind vermutlich eine direkte oder indirekte Auswirkung des Gendefektes in PA3757 und der daraus resultierenden fehlenden Regulatoraktivität. Zu diesen Proteinen gehören das hypothetische Glucose-sensitive Porin PA2291, das Glucose/Carbohydrat durchlässige Porin OprB (PA3186; Wylie und Worobec, 1995) sowie PA3190, ein potentielles Bindeprotein eines ABC Zucker-Transporters. Die reprimierte Produktion dieser Proteine könnte eine verringerte Glucoseaufnahme der Zelle zur Folge haben, das den beobachteten Wachstumsphänotyp erklären könnte.

Ein geringeres Wachstum aufgrund eines durch verringerte Glucoseaufnahme induzierten Glucosemangels in der Zelle würde auch unter aeroben Bedingungen erwartet werden, interessanterweise konnte jedoch kein aerober Wachstumsphänotyp beobachtet werden. Verantwortlich für die spezifisch anaeroben Auswirkungen der verminderten Glucoseaufnahme in die Zelle ist vermutlich der über unterschiedliche Enzyme verlaufende Glucoseabbau unter aeroben und anaeroben Bedingungen (Lessie and Phibbs, 1984), bzw. die effektivere Energiegewinnung unter aeroben Bedingungen.

Die verringerte Bildung der β -Kette der ATP-Synthase, kodiert durch das Gen *atpD*, ist womöglich eine Anpassung an den verringerten Glucose-Abbau. Die Regulation nur einer der Untereinheiten der ATP-Synthase (*atpIBEFHAGDC*) ist entweder ein Artefakt oder eine Auswirkung der Grenzen der hier durchgeführten Proteomanalyse, in der membranständige Untereinheiten (*atpBEF*) nicht aufgetrennt werden können. Ebenfalls nicht aufgetrennt wurden Proteine mit einem isoelektrischen Punkt außerhalb von pH 5 - 8, so dass die γ - (pI 8.35) und ϵ -Untereinheiten (pI 4.94) der ATP-Synthase, kodiert durch die Gene *atpG* bzw. *atpC*, sowie das Protein AtpI (pI 10.69, hypothetische pI-Werte siehe www.prodoric.de) vermutlich am Rand des Gels liefen. Des weiteren lag das Trennvermögen des verwendeten 10 %igen Polyacrylamid-Gels bei einer Mindestgröße von ca. 18 kDa, so dass kleinere Proteine wie z.B. das Protein AtpI mit einer hypothetischen Masse von 13.65 kDa (www.prodoric.de) nicht detektiert werden konnten.

Eine verstärkte Produktion von Proteinen in der Mutante DHpa3757 im Vergleich zu MS1 könnte zum einen an der Mutation des *pcs*-Gens in der Mutante MS1 liegen, zum anderen an einer fehlenden reprimierenden Funktion des potentiellen Regulators PA3757 in der Mutante DHpa3757. Des weiteren könnte die vermehrte Bildung mancher Proteine in der Mutante DHpa3757 im Vergleich zu MS1 auf Kompensationseffekte zurückgeführt werden. Hierzu zählt wahrscheinlich die verstärkte Bildung des Porins OprF (PA 1777; Duchene *et al.*, 1988) in der Mutante PsDH3757, das der geringeren Glucoseaufnahme in die Zelle entgegenwirken könnte. Ebenfalls in diese Kategorie fällt vermutlich die verstärkte Bildung der E2-Untereinheit der Dihydrolipoamid-Succinyltransferase SucB, einem Enzym des Citratcyclus, und der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase AceF, einem Enzym der Glykolyse/Gluconeogenese bzw. des Pyruvatmetabolismus in der Mutante PsDH3757, die S-Succinyl- bzw. 6-S-Acetyl-Dihydrolipoamid reversibel in Dihydrolipoamid und Succinyl-CoA bzw. Acetyl-CoA umsetzen (www.genome.jp/kegg).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der potentielle Regulator PA3757 unter anaeroben Bedingungen an der Regulation der Glucoseaufnahme über die Regulation der Porine OprB und PA2291 sowie eines hypothetischen ABC Zucker-Transporters (PA3187-3190) über dessen Bindeprotein PA3190 beteiligt ist.

3.3 Untersuchung denitrifizierender und mikroaerober Chemostat-Kulturen von *P. aeruginosa*

Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* stellen vor allem für Mukoviszidose-PatientInnen ein großes Gesundheitsrisiko dar. Bei gesunden Menschen sind die Epithelzellen der Atemwege für den Transport von Chloridionen an deren Oberfläche verantwortlich. Bedingt durch die erhöhte Ionenkonzentration tritt Wasser an die Oberfläche, das den sekretierten Schleim verflüssigt, der anschließend von den Cilien aus der Lunge abtransportiert wird. Bei PatientInnen, die an der Erbkrankheit Mukoviszidose leiden, wird der für den Chlorid-Transport zuständige Regulator CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) entweder nicht gebildet oder durch eine Mutation verändert, die seine Funktion verhindert. Aufgrund der zu geringen Ausscheidung an Chloridionen wird Wasser von den Epithelzellen reabsorbiert, wodurch sich die Viskosität der Mucusschicht erhöht. Diese zähflüssige Mucusschicht verklebt die Cilien, wodurch ein Abtransport erschwert bzw. sogar ganz verhindert wird. Des weiteren wurde gezeigt, dass die Diffusion von Sauerstoff durch die verdickte Mucusschicht erschwert wird, so dass sich innerhalb dieser Schicht ein Sauerstoffgradient von aerob bis anaerob ausbildet, mit der anaeroben Schicht direkt oberhalb der Sauerstoff-verbrauchenden Epithelzellen (Hassett *et al.*, 2002).

Diese hochviskose, schwer abtransportierbare Schleimschicht bildet eine perfekte Nische für *P. aeruginosa*, ein Bakterium, dass sich sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen vermehren kann. Bei einer Infektion setzt sich *P. aeruginosa* in der unteren, einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck aufweisenden Schleimschicht fest und bildet dort Biofilm-ähnliche Mikrokolonien. Durch die Ausscheidung des Virulenzfaktors Alginate wird die Diffusion von Sauerstoff im Mucus verringert. Zusammen mit dem Sauerstoffverbrauch der Epithelzellen sowie von *P. aeruginosa* wird der Sauerstoffgradient weiter in Richtung anaerob verschoben, so dass dieser nunmehr von mikroaerob bis anaerob reicht, wodurch die Atmung der PatientInnen weiter erschwert wird (Hassett *et al.*, 2002).

P. aeruginosa nutzt unter diesen Bedingungen zur Atmung entweder geringe Mengen an Sauerstoff, oder die alternativen terminalen Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit. Letztere konnten in Konzentrationen von $383 \pm 42 \mu\text{M}$ an Nitrat bzw. $125 \pm 55 \mu\text{M}$ an Nitrit in CF-Sputum detektiert werden (Hassett *et al.*, 2002).

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Unterschiede im Transkriptom und Proteom von *P. aeruginosa* unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen zu bestimmen. Um einen definierten Sauerstoffpartialdruck sowie konstantes Wachstum der *P. aeruginosa*

Zellen zu gewährleisten, wurden anstelle der bisher verwendeten *batch*-Kulturen Chemostat-Kulturen verwendet. Abb. 22 zeigt den schematischen Aufbau eines Chemostaten. Die Bakterien wurden in Minimalmedium mit 20 mM Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert, mit dem jeweiligen terminalen Elektronenakzeptor (Nitrat bzw. molekularer Sauerstoff) als limitierendem Wachstumsfaktor. Nach zwei Tagen befanden sich die Kulturen in einem stabilen logarithmischen Zustand, nach vier Tagen jedoch setzte Biofilmbildung an den Glaswänden des Chemostaten ein. Um eine Beeinflussung der Kulturen durch Biofilmbildung zu vermeiden, erfolgte die Probennahme für sowohl Transkriptom- als auch Proteomanalysen am zweiten sowie am dritten Tag.

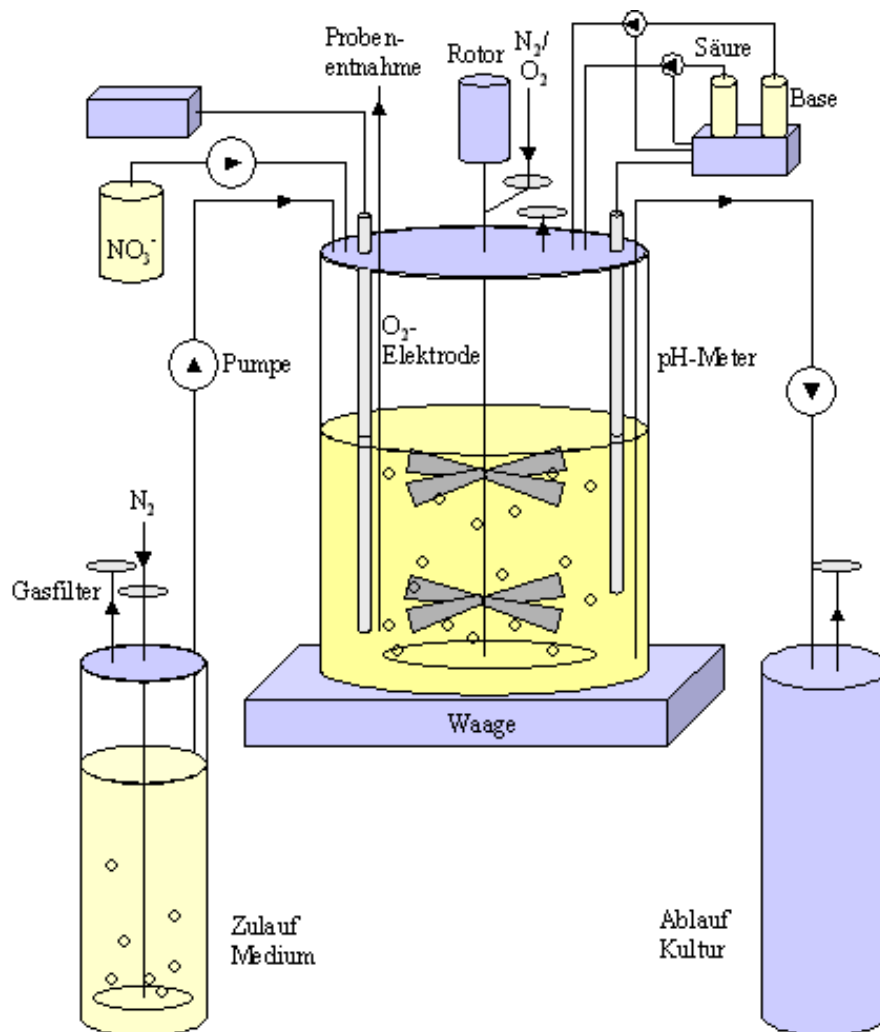


Abb. 22: Schematischer Aufbau des verwendeten Chemostaten. Das Kulturvolumen im 2.5 l-Chemostat betrug 1.2 l, Zu- und Ablauf des Mediums bzw. der Kultur erfolgte aus bzw. in 20 l-Behälter. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode gemessen und mittels automatischer HCl bzw. NaOH-Zugabe konstant bei 7.0 ± 0.2 gehalten. Unter denitrifizierenden Bedingungen wurde N₂ zugeleitet sowie Nitrat als alternativer terminaler Elektronenakzeptor in einer Konzentration von 15 mM zugegeben. Die Gaszufuhr betrug 0.1 l pro min., wobei unter denitrifizierenden Bedingungen N₂ eingeleitet wurde. Unter mikroaeroben Bedingungen wurde der Stickstoff mit Luft in einem Verhältnis von 4:1 N₂:Luft versetzt. Für beide Kulturen betrug die Sauerstoffsättigung 0 %. Die Überprüfung erfolgte mit einer Sauerstoffelektrode. Alle Zu- und Ableitungen für Gase waren mit einem Gasfilter versehen. Die Verdünnungsrate jeder Chemostat-Kultur betrug 0.2 l pro h.

3.3.1 Vergleichende Transkriptomanalyse denitrifizierender gegenüber mikroaerober *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen

Um festzustellen, welche Gene bei der Atmung unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert sind, wurde eine Transkriptomanalyse entsprechend gewachsener Chemostat-Kulturen durchgeführt. Die einzig unterschiedliche Komponente beider Kulturen war der terminale Elektronenakzeptor, dessen Konzentration wachstumslimitierend war. Es wurden je Chemostat-Kultur zwei Microarrays ausgewertet, wobei von den insgesamt 5570 auf dem *P. aeruginosa*-Chromosom vorhandenen ORFs unter denitrifizierendem Wachstum Hybridisierungssignale von Transkripten von 1020 Genen detektiert werden konnten, gegenüber Hybridisierungssignalen von Transkripten von 1099 Genen unter mikroaerobem Wachstum. Die vergleichende Transkriptomanalyse ergab unter Berücksichtigung eines Detektions-Grenzwertes der Signalintensität von 40, dass 94 Gene unterschiedlich stark exprimiert wurden. Abb. 23 teilt die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induzierten und reprimierten Gene verschiedenen funktionellen Klassen zu (nach www.pseudomonas.com).

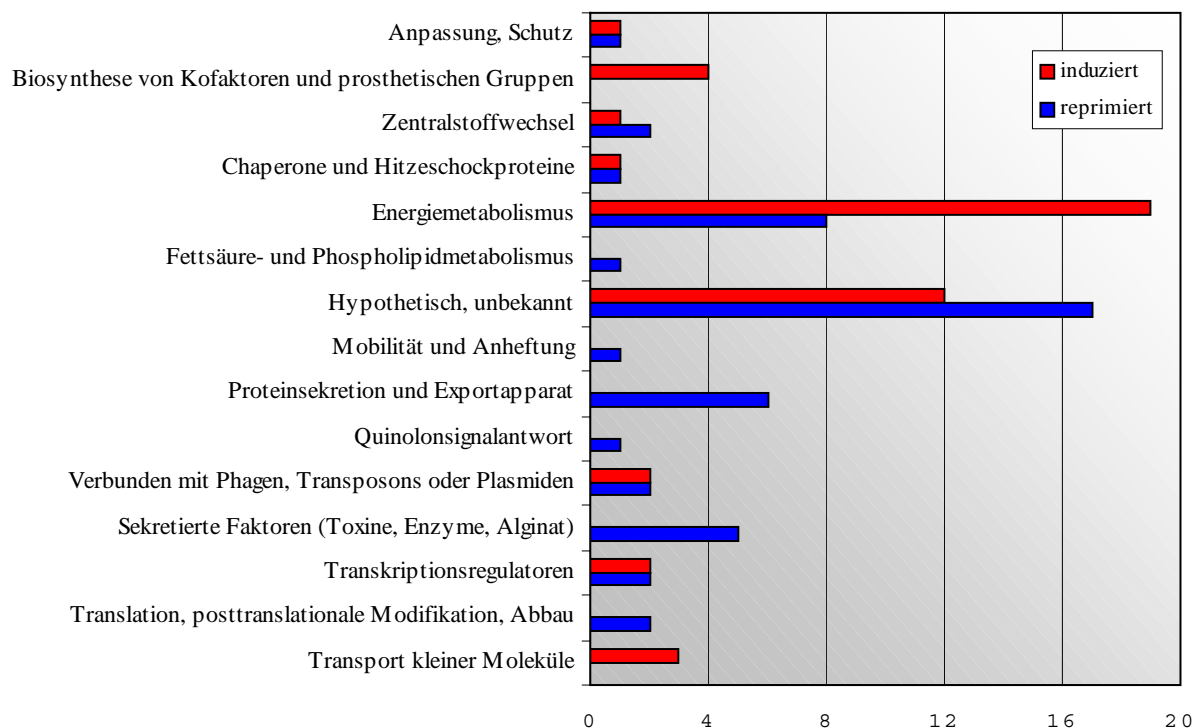


Abb. 23: Anzahl von Genen, eingeteilt in funktionelle Klassen (nach www.pseudomonas.com), die in einer *P. aeruginosa* Chemostat-Kultur unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert (rote Balken) oder reprimiert (blaue Balken) wurden. Die Genexpression wurde mittels Affymetrix GeneChips ermittelt.

Wie aus Abb. 23 ersichtlich, können die unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen unterschiedlich regulierten Gene vor allem zwei Gruppen zugeordnet werden, der Gruppe kodierend für hypothetische, unbekannte Proteine (31 %) und der Gruppe des Energiestoffwechsels (29 %).

3.3.1.1 Das differentielle Anr-Regulon denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostat-Kulturen

Unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck wird in *P. aeruginosa* das Anr-Regulon induziert. Anr selbst besitzt analog zu Fnr aus *E. coli* in seiner aktiven Form ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, der in Gegenwart von Sauerstoff über einen $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ zu einem $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster degradiert wird. Diese Umwandlung wird durch eine Konformationsänderung begleitet, wodurch die Funktionalität von Anr als transkriptionellem Regulator zerstört wird (Crack *et al.*, 2004). Für die vorliegende Arbeit war von Interesse, welche Gene des Anr-Regulons unter Sauerstoff-freien Wachstumsbedingungen mit Nitrat als Elektronenendakzeptor gegenüber der Verwendung niedriger Sauerstoffkonzentrationen im Falle mikroaeroben Wachstums unterschiedlich exprimiert werden. Interessanterweise konnte sowohl unter denitrifizierenden als auch unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen ein vergleichbar starkes Hybridisierungssignal und somit eine ähnlich starke Transkription des *anr*-Gens detektiert werden. Die Transkription von *anr* wird demnach unterhalb einer gewissen Sauerstoffkonzentration aktiviert, ohne weitere Induktion unter Sauerstoff-freien Bedingungen.

Trotz gleicher Transkriptmenge wurde dennoch aufgrund der Inaktivierung von Anr durch Sauerstoff unter mikroaeroben gegenüber anaeroben Bedingungen eine unterschiedliche Expression einzelner dem Anr-Regulon zugehöriger Gene erwartet. Eine solche Sauerstoffkonzentrations-abhängige Anr-Regulation könnte auf unterschiedliche Konservierungsstärken der Anr-Bindesequenz der einzelnen Promotoren zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Korrelation zwischen der Stärke der Konservierung der Anr-Box und der Promotoraktivität innerhalb einer Wachstumsbedingung denkbar. Des weiteren könnten zusätzliche Regulatoren, wie z.B. der über den Nitrat-Sensor NarX aktivierbare Regulator NarL, an der differentiellen Regulation Anr-abhängiger Gene unter mikroaeroben und denitrifizierenden Wachstumsbedingungen beteiligt sein. Anr könnte zudem einen reprimierenden Effekt auf mikroaerobe Gene unter anaeroben Bedingungen ausüben.

Zur Analyse des Anr-Regulons denitrifizierender sowie mikroaerober Chemostat-Kulturen wurde das *P. aeruginosa*-Chromosom auf Anr-Bindestellen im intergenischen Bereich potentieller Promotorregionen aller *open reading frames* (ORFs) untersucht. Hierfür wurde von Richard Münch die unter 3.1.6.2 beschriebene *weight matrix* Analyse durchgeführt, wodurch 89 potentielle Anr-Bindestellen identifiziert wurden. Zwanzig Gene, die unter beiden Wachstumsbedingungen gleich stark exprimiert wurden, enthielten in ihren zugehörigen hypothetischen Promotorregionen Anr-Bindestellen (siehe Tab. 21).

Tab. 21: Gene, deren Promotoren eine potentielle Anr-Bindesequenz aufweisen und deren Expression unter denitrifizierenden und mikroaeroben Bedingungen ähnlich stark war. S DCh und S MCh geben die Signalintensitäten der entsprechenden Transkripte der denitrifizierenden (DCh) und mikroaeroben (MCh) Chemostat-Kulturen wieder.

Gen	Distanz der Anr-Sequenz vom ATG (bp)	S DCh	S MCh	Protein/ Funktion
PA0837 <i>slyD</i>	111	64	88	Peptidylprolyl isomerase, FKBP-type
PA0962	85	157	265	putative DNA-binding protein, protection of DNA from oxidative damage
PA1544 <i>anr</i>	120	146	236	regulator Anr
PA1673	81	105	68	putative Hemerythrin
PA1746	84	87	141	putative protein associated with DNA and/or RNA unwinding
PA2575	226	70	84	putative NADH oxidase/flavin reductase
PA2867	73	62	53	putative chemotaxis sensory transducer, histidine kinase & HAMP domains
PA3309	86	180	148	putative stress protein, USP domain
PA3614	110	97	72	putative Beta-lactamase, class B
PA4067 <i>oprG</i>	71	276	389	Outer membrane protein OprG precursor
PA4463	62	374	479	putative Sigma 54 modulation protein/ribosomal protein S30EA
PA4563 <i>rpsT</i>	243	863	913	30S ribosomal protein S20
PA4578	126	572	651	hypothetical protein
PA4587 <i>ccpR</i>	68	257	289	cytochrome <i>c_{55I}</i> peroxidase precursor
PA4595	334	91	74	putative ABC transporter protein, ATP-binding subunit
PA4596	146	80	49	putative transcriptional regulator, Homeodomain
PA4696 <i>ilvI</i>	301	100	155	Pyruvate decarboxylase, Acetolactate synthase
PA4697	237	104	121	hypothetical protein
PA4922 <i>azu</i>	73	1961	1922	azurin
PA5170 <i>arcD</i>	65	121	150	arginine/ornithine antiporter

Unter diesen befand sich neben dem bereits erwähnten Gen *anr* das Gen PA4587, kodierend für die Cytochrom *c_{55I}* Peroxidase CcpR. Diese Peroxidase ist ein periplasmatisches Membranprotein, das die Zelle vor toxischen Peroxiden schützt (Ellfolk *et al.*, 1991; Fülöp *et al.*, 1995). Die Elektronen für die Reduktion der Peroxide erhält CcpR vermutlich von den Elektronenüberträgern Ferrocycytochrom *c_{55I}* sowie dem Kupfer-haltigen Protein Azurin (Foote

et al., 1992; siehe auch 3.1.4.1). Das Gen kodierend für Azurin (PA4922) wurde ebenfalls unter sowohl denitrifizierenden als auch mikroaeroben Bedingungen in vergleichbarer Stärke transkribiert.

Aufgrund der oben erwähnten Degradation des Eisen-Schwefel-Clusters und der damit einhergehenden Abnahme der Funktionalität von Anr in der Gegenwart von Sauerstoff wurde erwartet, dass unter strikt anaeroben Bedingungen die Anzahl der Anr-induzierten Gene am höchsten ist. Im Einklang mit dieser Hypothese war der Befund, dass 18 Gene mit einer hypothetischen Anr-Bindestelle unter denitrifizierenden Bedingungen im Vergleich zu mikroaeroben Kulturen induziert waren (Tab 22). Drei dieser Gene bzw. Operons, *nirSMC*, *norCBD* und *nosRZDFYL*, stehen jedoch unter der Kontrolle von Dnr (siehe Kap. 3.1.6.1), einem Transkriptionsregulator, der an die gleiche DNA-Sequenz bindet wie Anr (Arai *et al.*, 1995). Das Transkript für Dnr selbst konnte unter denitrifizierenden Bedingungen nicht detektiert werden. Die spezifische Transkription Dnr-abhängiger Gene unter denitrifizierenden Bedingungen ist jedoch im Einklang mit der bekannten Regulationskaskade, nach der Anr und NarL, letzterer der Antwortregulator des Nitrat-Sensor-Systems NarX/L, die Transkription von *dnr* induzieren (Krieger, 2001). Dnr wiederum induziert die Transkription der Nitratreduktase-Gene sowie der nachfolgenden Reduktasen der Denitrifikationskaskade.

Besonders interessant in der Gruppe der spezifisch unter denitrifizierenden Bedingungen induzierten Anr-abhängigen Gene ist *bfrA*, dessen Genprodukt Bacterioferritin A den Eisenhaushalt der Bakterien reguliert (Moore *et al.*, 1994). Unter mikroaeroben Bedingungen wird diese Aufgabe anscheinend von Bacterioferritin B übernommen, dessen Gen keine Anr-Bindestelle im Promotor aufweist und unter denitrifizierenden Bedingungen im Vergleich mit mikroaeroben Bedingungen reprimiert war.

Aufgrund seiner hohen Expression unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen ist das Gen PA3880 ebenfalls von Interesse, auch wenn die Aminosäure-Sequenz des hypothetischen Proteins keine bekannte Domänenstruktur aufweist. Die Transkriptionsaktivierung von PA5497 kann nicht eindeutig dem Regulator Anr zugeschrieben werden, da die Anr-Bindestelle nur 15 bp vom ATG-Startcodon entfernt liegt. Die optimale Entfernung der Anr-Bindesequenz vom Transkriptionsstart beträgt jedoch 41.5 bzw. 61.5 bp, da eine Bindung an dieser Stelle eine optimale Aktivierung der RNA-Polymerase ermöglicht. Eine Bindestelle 15 bp vom Translationsstart entfernt dürfte dagegen eher inhibierend auf die Bindung der Ribosomen an das Transkript wirken und somit die Produktion des entsprechenden Proteins erschweren. Möglich wäre auch ein Fehler in der automatisch erfolgten Annotation dieses

Gens, das möglicherweise kürzer als angegeben ist, so dass die potentielle Anr-Bindestelle in einer aktivierenden Entfernung zum Transkriptionsstart liegen könnte.

Tab. 22: Gene, deren Promotoren eine potentielle Anr-Bindesequenz aufweisen und deren Expression unter denitrifizierenden gegenüber mikraeroben Bedingungen induziert war. S DCh und S MCh geben die Signalintensitäten der entsprechenden Transkripte der denitrifizierenden (DCh) und mikraeroben (MCh) Chemostat-Kulturen wieder. Als *absent* detektierte Signalintensitäten sind mit A gekennzeichnet. Obwohl die ersten Gene der beiden Operons *nosRZDFYL* und *narK₁K₂GHJI* nicht detektiert werden konnten, waren die nachfolgenden Gene stark reguliert. Die angegebenen Signalintensitäten für die Operons entsprechen der Signalintensität des dem entsprechenden Operon zugehörigen Gens mit der stärksten Expression. Die Regulation durch Dnr, welcher an die gleiche DNA-Sequenz wie Anr bindet, ist angegeben.

Gen	Distanz vom ATG (bp)	S DCh	S MCh	Protein/ Funktion
PA0224	74	64	A	putative class II aldolase
PA0519 <i>nirS</i>	124	1563	85	Dnr nitrite reductase
PA0520 <i>nirQ</i>	79	227	A	regulatory protein
PA0523 <i>norC</i>	58	748	A	Dnr nitric-oxide reductase
PA0526	57	133	A	hypothetical protein
PA0836	183	49	A	putative acetate kinase
PA1545	113	59	A	putative soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor (SNARE)
PA1863 <i>modA</i>	96	58	A	molybdate-binding periplasmic protein
PA1920	85	67	A	putative ATP-cone domain
PA2119	94	59	A	putative alcohol dehydrogenase
PA3391 <i>nosRZDFYL</i>	121	576	A	Dnr nitrous oxide reductase
PA3880	58	558	A	hypothetical protein
PA3877 <i>narK₁K₂GHJI</i>	63	480	A	nitrate/nitrite antiporter and nitrate reductase
PA3913	94	101	A	putative peptidase U32
PA4235 <i>bfrA</i>	58	220	93	bacterioferritin A
PA4610	53	80	A	hypothetical protein
PA4812 <i>fdnG</i>	142	48	A	Molybdopterin oxidoreductase, nitrate-inducible formate dehydrogenase
PA5497	15	116	39	putative ribonucleotide reductase, large subunit

Interessanterweise waren fünf Gene bzw. Operons mit einer hypothetischen Anr-Bindestelle unter denitrifizierenden Bedingungen im Vergleich zu mikraerobem Wachstum reprimiert (Tab. 23), darunter das Gen PA1557, das für eine *cbb₃*-artige Cytochromoxidase kodiert. Um festzustellen, ob diese fünf Gene/Operons spezifisch unter mikraeroben Bedingungen induziert wurden, oder ob unter denitrifizierenden Bedingungen eine durch Anr vermittelte Transkriptionshibierung vorlag, wurden die Transkriptomdaten beider Chemostat-Kulturen mit den unter 3.1 beschriebenen Transkriptomdaten aerob gewachsener *batch*-Kulturen verglichen. Diese Analyse zeigte für alle fünf Gene/Operons eine Induktion unter

mikroaeroben gegenüber aeroben Wachstumsbedingungen, so dass hier eine durch Anr vermittelte Transkriptionsaktivierung vorlag.

Tab. 23: Gene mit einer potentiellen Anr-Bindesequenz, die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert waren. S DCh und S MCh geben die Signalintensitäten der entsprechenden Transkripte der denitrifizierenden (DCh) und mikroaeroben (MCh) Chemostat-Kulturen wieder. Als *absent* detektierte Signalintensitäten sind mit A gekennzeichnet. Obwohl das erste Gen des Operons *phzA2-G2* nicht detektiert werden konnte, waren die nachfolgenden Gene stark reguliert. Die angegebene Signalintensität für dieses Operon entspricht der Signalintensität des dem entsprechenden Operon zugehörigen Gens mit der stärksten Transkriptintensität.

Gen	Distanz vom ATG (bp)	S DCh	S MCh	Protein/ Funktion
PA0141	249	A	153	hypothetical protein
PA1557	135	122	237	cytochrome oxidase <i>cbb₃</i> -type
PA1899 <i>phzA2-G2</i>	193	A	197	phenazine biosynthesis proteins
PA4352	67	A	130	putative stress protein, Usp-domain
PA5475	76	A	73	putative GCN5-related N-acetyltransferase of histones

3.3.1.2 Die Konservierung der Anr-Bindesequenz übt keinen Einfluss auf die differentielle Regulation Anr-abhängiger Gene unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen aus

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Anzahl Anr-regulierter Gene beider Chemostat-Kulturen wäre die Stärke der Konservierung der DNA-Bindesequenz. Aufgrund der Inaktivierung von Anr durch Sauerstoff wurde angenommen, dass unter mikroaeroben Bedingungen weniger aktives Anr in der Zelle vorhanden ist als unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen, und somit in einem mikroaeroben Milieu vermehrt Gene mit hochkonservierter DNA-Bindestelle induziert werden. Hierunter fallen ebenfalls die Gene, deren Transkriptstärke unter beiden Wachstumsbedingungen vergleichbar sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Analyse mittels des unter 3.1.4 vorgestellten *weight matrix* Modells vorgenommen, das die Konservierung des Anr-Motifs mittels einem Wert für den Grad der Konservierung (Score) belegt. Der beste Score mit 14.74 wurde der Anr-Bindestelle im Promotor des *norC*-Gens zugeteilt. Gene, deren Promotoren Anr-Bindestellen geringerer Konservierung aufweisen, und somit einen Score weit niedriger als 14.74 besitzen, sollten nur unter strikt anaeroben Bedingungen induziert werden. Ein Vergleich der Scores der Anr-Boxen der 20 bei beiden Chemostat-Kulturen induzierten Gene (13.73 +/- 0.63) mit den Scores der Anr-Boxen der 18 Gene, die unter denitrifizierenden Bedingungen im Vergleich zu mikroaerobem Wachstum induziert waren (13.84 +/- 0.62), ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Tab. 24: Stärke der Konservierung potentieller Anr-Bindesequenzen, angegeben in Scores, von detektierten, in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikroaeroben (MCh) Chemostat-Kulturen nicht unterschiedlich regulierten Genen gegenüber Genen, die differentiell reguliert waren. Ebenfalls angegeben sind potentielle NarL-Bindestellen (www.prodoric.de).

Gen	Anr-Box	Score	Distanz vom ATG	reguliert durch	potentielle NarL-Bindestelle
nicht reguliert DCh vs. MCh					
PA0837 <i>slyD</i>	CTGATGAAAATCAA	13.62	111	Anr	
PA0962	TTGGTCTATGTCAA	13.46	85	Anr	
PA1544 <i>anr</i>	GTGACTTGCGTCAA	13.16	120	Anr	x
PA1673	TTGATCGGCGTCAA	14.35	81	Anr	x
PA1746	TTGATACGCATCAA	14.86	84	Anr	x
PA2575	TTGACCTGAATCAA	14.69	226	Anr	
PA2867	TTGACCCGCATCAA	14.59	73	Anr	
PA3309	TTGCCGGAGGTCAA	13.03	86	Anr	
PA3614	CTGACCTGCATCAA	13.67	110	Anr	
PA4067 <i>oprG</i>	TTGAGCTGTGTCAA	14.01	71	Anr	x
PA4463	TTGGCGTGGATCAA	13.60	62	Anr	
PA4563 <i>rpST</i>	TTGGACAGGATCAA	12.99	243	Anr	
PA4578	CTGACGCCGGTCAA	13.12	126	Anr	
PA4587 <i>ccpR</i>	TTGATCCACGTCAA	14.71	68	Anr	
PA4595	CTGATTTGGATCAA	13.95	334	Anr	x
PA4596	TTGATCCAAATCAG	13.95	146	Anr	x
PA4696 <i>ilvI</i>	CTGAAAATTATCAA	12.99	301	Anr	x
PA4697	CTGAAAATTATCAA	12.99	237	Anr	x
PA4922 <i>azu</i>	TTGACCTGAATCAG	13.44	73	Anr	
PA5170 <i>arcD</i>	TTGACGTGGATCAG	13.46	65	Anr	x
induziert DCh vs. MCh					
PA0224	TTGATCCGTGTCTAT	13.51	74	Dnr	x
PA0519 <i>nirS</i>	TTGATTCCGGTCAA	14.46	124	Dnr	x
PA0520 <i>nirQ</i>	TTGACCGGAATCAA	14.46	79	Anr	x
PA0523 <i>norC</i>	TTGATTGCCATCAA	14.74	58	Dnr	
PA0526	TTGATCGCGGTCAA	14.47	57	Anr	
PA0836	TTGATTTTCATCAG	13.62	183	Anr	
PA1545	GTGACTTGCGTCAA	13.16	113	Anr	x
PA1863 <i>modA</i>	TTGCGCCGGATCAA	13.26	96	Anr	x
PA1920	CTGACGCAGATCAA	13.56	85	Anr	
PA2119	ATGACCCATATCAA	13.18	94	Anr	
PA3391 <i>nosRZDFYL</i>	TTGACTTTCATCAA	14.67	121	Dnr	
PA3877 <i>narK1K2GHJI</i>	TTGATTCCCTATCAA	14.81	63	Anr	
PA3880	TTGATTCCGGTCAA	14.44	58	Anr	
PA3913	TTGATCCCGGTCAA	14.44	94	Anr	
PA4235 <i>bfrA</i>	TTGACCCGGATCAG	13.41	58	Anr	x
PA4610	TTGATTCCGATCAG	13.69	53	Anr	
PA4812 <i>fdnG</i>	ATGACTCCGGTCAA	13.09	142	Anr	x
PA5497	TTGATTCCCGTCAG	13.41	15	Anr	x
reprimiert DCh vs MCh					
PA0141	TTGATGGGGGTCAA	14.57	249	Anr	x
PA1557	TTGATCCCGATCAA	14.76	135	Anr	x
PA1899 <i>phzA2-G2</i>	TTGTCCCCTGTCAA	13.16	193	Anr	x
PA4352	TTGATGCACATCAA	14.99	67	Anr	x
PA5475	TTGATGTCGATCAA	14.78	76	Anr	

Die Stärke der Konservierung der Anr-Bindesequenz scheint somit keinen Einfluss auf die unterschiedliche Regulation Anr-abhängiger Gene unter den untersuchten Atmungsbedingungen zu besitzen. Es konnte zudem keine Korrelation zwischen der Promotoraktivität eines Gens und der Höhe der im Promotor befindlichen hypothetischen Anr-Bindesequenzkonservierung festgestellt werden. Ein Einfluss von NarL wurde ebenfalls ausgeschlossen, da eine *weight matrix* Analyse der Anr-Bindestellen in Verbindung mit mindestens einer potentiellen NarL-Bindestelle (www.prodoric.de) eine zufällige Verteilung unter den Gruppen der nicht regulierten und der unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen unterschiedlich regulierten Gene ergab. Demnach scheinen zusätzliche regulatorische Elemente, wie z.B. der Transkriptionsregulator Dnr, für die differentielle Genregulation zuständig zu sein. Eine Reprimierung mikroaerob induzierter Gene unter anaeroben Bedingungen ist allein für PA1557 denkbar, da dieses im kodierenden Bereich eine hypothetische Anr-Bindesequenz mit einem Score von 13.66 besitzt.

3.3.1.3 Die Gene der Nitratatmung sind unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert

Ein Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die für den Energiemetabolismus von *P. aeruginosa* unter mikroaeroben gegenüber denitrifizierenden Bedingungen induziert sind. Wie für Kulturen erwartet wurde, die zur Atmung Nitrat als alternativen Elektronenrezeptor verwenden, waren die Gene der Nitratatmung speziell unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen stark induziert (Tab. 25). Dies entspricht dem experimentellen Aufbau und validiert die durchgeführten Affymetrix Analysen.

Wie bereits unter 1.2.2 erwähnt, sind die Nitratatmungs-Gene unter der Kontrolle des globalen anaeroben Regulators Anr, dem Zwei-Komponenten-System NarXL, dem Transkriptionsregulator Dnr und dem posttranslationalen Regulator NirQ. Obwohl keine Expression der zwei Transkriptionsregulatoren Dnr und NarL detektiert werden konnte, waren die unter der Kontrolle der zwei Regulatoren stehenden Operons *nir*, *nor* und *nos* stark induziert. Dies impliziert, dass im Gegensatz zu Anr, dessen Transkript sowohl unter denitrifizierenden als auch mikroaeroben Bedingungen deutlich detektierbar war, nur geringe Mengen an *dnr* und *narL*-mRNAs vorhanden waren. Dies könnte auf ihr im Vergleich zum Anr-Regulon kleineres Regulon zurückzuführen sein, wodurch weniger Dnr und NarL benötigt werden, oder auf eine stärkere posttranskriptionelle Regulation.

Tab. 25: Gene, die in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikraeroben (MCh) *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen induziert waren. Die Signalintensitäten der Transkripte der Gene *nosR* und *narK₁* lagen unter der Nachweisgrenze, so dass keine Regulationsstärke angegeben werden konnte. Die Auflistung erfolgte aufgrund ihrer Position als erstem Gen der entsprechenden Operons, die unter der Kontrolle von Anr liegen und deren nachfolgenden Gene stark reguliert waren. Die Angabe des Regulators erfolgte nur für das erste Gen des jeweiligen Operons.

Gen	Protein/ Funktion	reguliert durch	n-fache Regulation DCh vs. MCh
PA0509 <i>nirN</i>	probable <i>c</i> -type cytochrome		4, 7
PA0510	probable uroporphyrin-III <i>c</i> -methyltransferase		6, 8
PA0511 <i>nirJ</i>	heme <i>d_l</i> biosynthesis protein NirJ		3, 9
PA0512	putative winged helix DNA-binding domain		3, 6
PA0513	probable transcriptional regulator		4, 9
PA0514 <i>nirL</i>	heme <i>d_l</i> biosynthesis protein NirL		4, 5
PA0515	probable transcriptional regulator		9, 4
PA0516 <i>nirF</i>	heme <i>d_l</i> biosynthesis protein NirF		6, 2
PA0517 <i>nirC</i>	probable <i>c</i> -type cytochrome precursor		20, 4
PA0518 <i>nirM</i>	cytochrome <i>c₅₅₁</i> precursor		14, 9
PA0519 <i>nirS</i>	nitrite reductase precursor	Dnr	19, 4
PA0520 <i>nirQ</i>	regulatory protein NirQ	Anr	8, 1
PA0521	probable cytochrome <i>c</i> oxidase subunit		2, 8
PA0522	hypothetical protein		2, 8
PA0523 <i>norC</i>	nitric-oxide reductase subunit C	Dnr	20, 7
PA0524 <i>norB</i>	nitric-oxide reductase subunit B		27, 9
PA0525	probable dinitrification protein NorD		19, 4
PA0526	hypothetical protein	Anr	6, 3
PA3391 <i>nosR</i>	regulatory protein NosR	Dnr	
PA3392 <i>nosZ</i>	nitrous-oxide reductase precursor		35, 5
PA3393 <i>nosD</i>	NosD protein		3, 9
PA3394 <i>nosF</i>	NosF protein		13, 7
PA3396 <i>nosL</i>	NosL protein		2, 8
PA3871	probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type		4, 8
PA3872 <i>narI</i>	respiratory nitrate reductase gamma chain		8, 3
PA3873 <i>narJ</i>	respiratory nitrate reductase delta chain		4, 9
PA3874 <i>narH</i>	respiratory nitrate reductase beta chain		24, 7
PA3875 <i>narG</i>	respiratory nitrate reductase alpha chain		23, 8
PA3876 <i>narK2</i>	nitrite extrusion protein 2		4, 4
PA3877 <i>narK1</i>	nitrite extrusion protein 1	Anr	

Der erste Schritt der Denitrifikation besteht in der Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Diese Reaktion wird von der cytoplasmatischen, membrangebundenen Nitratreduktase durchgeführt, deren Gene, kodierend für die Untereinheiten NarGHJI, in einem Operon mit den Genen für den potentiellen Nitrat-/Nitritantiporter NarK₁K₂ liegen (Carlson *et al.*, 1983; Vollack *et al.*, 1998). Die Annotation von letzterem beruht auf der hohen Homologie auf Aminosäuresequenzebene mit den entsprechenden Proteinen anderer Organismen (www.pseudomonas.com). Experimentell wurde eine Nitrat-/ Nitritantiporter Aktivität dieser Proteine in *P. aeruginosa* nicht gezeigt. Die Gene dieses Operons *narK₁K₂GHJI* waren unter

denitrifizierenden Bedingungen im Vergleich mit mikroaerob gewachsenen Kulturen bis zu 24.7-fach induziert. Der potentielle Antiporter NarK_1K_2 wird für die Translokation des Zellgifts Nitrit ins Periplasma benötigt, wo die Nitritreduktase NirS Nitrit in Stickstoffmonoxid umsetzt.



Abb. 24: Das Nitratreduktase-Operon aus *P. aeruginosa*.

nirS ist Teil des potentiellen Operons *nirSMC*, wobei *nirM* für Cytochrom c_{551} , den physiologischen Elektronendonator von NirS, kodiert und *nirC* für ein weiteres Cytochrom *c* (Arai *et al.*, 1990; Hasegawa *et al.*, 2001). Stromabwärts von *nirSMC* befinden sich die Gene der für die Synthese des Kofaktors d_I -Häm benötigten Enzyme (*nirFDLGHJE*). Dieser Kofaktor wird von NirS für seine Nitritreduktase-Aktivität benötigt (Kawasaki *et al.*, 1997). Weiter stromabwärts befindet sich das Gen *nirN*, welches wiederum für ein potentielles Cytochrom *c* kodiert (Kawasaki *et al.*, 1997). Ob *nirSMC* gemeinsam mit *nirFDLGHJEN* ein Operon bildet oder als *nirSMC*-Operon transkribiert wird, ist nicht bekannt. Northern Blot Analysen unter Verwendung einer Sonde gegen das Gen *nirS* ergaben eine Bande der Größe von *nirSMC* (siehe 3.1.1.1). Ob dieses Transkript als solches oder durch nachfolgende Prozessierung eines *nirSMCFDLGHJEN*-Transkripts gebildet wird, wurde nicht untersucht. Die Transkripte all dieser Gene waren unter denitrifizierenden Bedingungen bis zu 20.4-fach gegenüber mikroaeroben Kulturen induziert.

Stromaufwärts von dem *nirSMCFDLGHJEN* Gen-Cluster und divergent orientiert liegt das Operon *nirQOP*, dessen Gene bis zu 8.1-fach induziert waren. Das erste Gen dieses Operons kodiert für den Regulator NirQ, der posttranslational die Aktivitäten der Nitrat- und der Stickstoffmonoxid-Reduktase aufeinander abstimmt (Arai *et al.*, 1994). Stromabwärts von *nirQOP* befindet sich das Operon *norCBD*, dessen Gene für die zwei Untereinheiten NorCB der Stickstoffmonoxid-Reduktase kodieren (Arai *et al.*, 1995), welche bis zu 27.9-fach induziert waren. Benachbart zu *norCBD*, jedoch divergent orientiert, liegt PA0526, das für ein hypothetisches Protein unbekannter Struktur kodiert, welches eine hypothetische Anr-Box besitzt und 6.3-fach induziert war. Stromaufwärts von PA0526 liegt *dnr*, kodierend für den Transkriptionsregulator Dnr.

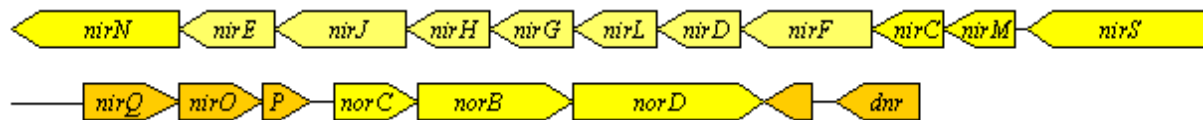


Abb. 25: Der Nitrit- und NO-Reduktase-Locus aus *P. aeruginosa*.

Die Umsetzung von Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff wird durch die Distickstoffmonoxid-Reduktase NosZ ausgeführt (Viebrock & Zumft, 1988; SooHoo und Hollocher, 1991), deren Gen im *nosRZDFYL* Gen-Cluster lokalisiert ist und dessen Gene bis zu 35.5-fach induziert waren. *nosR* kodiert für ein integrales Membranprotein, einem potentiellen Regulator (Cuypers *et al.*, 1992), während die Genprodukte von *nosDFY* wahrscheinlich für die Integration der vier Kupferatome in die Distickstoffmonoxid-Reduktase benötigt werden (Zumft *et al.*, 1990).



Abb. 26: Das N₂O-Reduktase-Operon aus *P. aeruginosa*.

3.3.1.4 Zwei Oxidasen des Typs *cbb₃* werden unter denitrifizierenden gegenüber mikraeroben Bedingungen gegensätzlich reguliert

Unterschiede in der Genexpression bezüglich des Energiemetabolismus von denitrifizierend gegenüber mikraerob gewachsenen Chemostat-Kulturen konnten des weiteren für zwei *cbb₃*-Oxidasen detektiert werden. Die Gene der zwei Oxidasen liegen im *P. aeruginosa*-Chromosom in einem Locus, mit PA1552-1554, kodierend für die Untereinheiten CcoNOQP der *cbb₃* Oxidase 1 und PA1555-1557, kodierend für die Untereinheiten der *cbb₃* Oxidase 2. Des weiteren besitzt *P. aeruginosa* ein weiteres Gen, PA4133, das für die katalytische Untereinheit CcoN der Cytochrom *c* Oxidase kodiert, in dessen genomischer Umgebung jedoch keine Gene der Untereinheiten CcoO und CcoP festgestellt werden konnten. Die erste vollständig charakterisierte proteobakterielle *cbb₃*-Oxidase war das Produkt des Rhizobien-Operons *fixNOQP*, welches für die Stickstoff-Fixierung benötigt wird (Preisig *et al.*, 1993; Mandon *et al.*, 1994). Verwandte Operons in nicht-diazotrophen Proteobakterien erhielten die Benennung *ccoNOQP* (Thöny-Meyer *et al.*, 1994; Myllykallio und Liebl, 2000). Die katalytische Untereinheit CcoN enthält im aktiven Zentrum Häm und Kupfer und ist mit den beiden Untereinheiten CcoO, einem Mono-Häm Cytochrom *c*, und CcoP, einem Di-Häm Cytochrom *c* assoziiert. Das Enzym enthält außerdem eine vierte Untereinheit, CcoQ, dass

wahrscheinlich für die Stabilität des katalytischen Zentrums von Bedeutung ist (Zufferey *et al.*, 1996; Oh und Kaplan, 2002). Die Gene dieser vierten Untereinheiten der *cbb₃*-Oxidasen 1 und 2 sind im *Pseudomonas*-Genom-Projekt nicht annotiert und auch nicht auf den GeneChips durch Sonden vertreten.

Um den Einfluss der verschiedenen *cbb₃*-Oxidasen bei der Atmung genauer zu untersuchen, wurden die Transkriptomdaten aerober *batch*-Kulturen, welche ebenfalls im exponentiellen Stadium bei einer $OD_{578} = 0.3$ geerntet wurden (siehe 3.1), mit den Transkriptomdaten der mikroaeroben und anaeroben Chemostat-Kulturen verglichen. Obwohl Cytochrom *c*-Oxidasen des Typs *cbb₃* gewöhnlich unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen exprimiert werden, ergab ein Vergleich der Transkriptomdaten ein unterschiedliches Expressionsverhalten der zwei *cbb₃*-Oxidasen unter aeroben, denitrifizierenden und mikroaeroben Wachstumsbedingungen (Tab. 26). Die Gene der *cbb₃* Oxidase 1 waren unter aeroben und denitrifizierenden Bedingungen gleich stark exprimiert und gegenüber mikroaerob gewachsenen Kulturen bis zu 4.1-fach induziert. Die Gene der *cbb₃* Oxidase 2 hingegen waren unter mikroaeroben Bedingungen am stärksten exprimiert, mit einer bis zu 113.8-fachen Induktion gegenüber aerob gewachsenen Zellen. Unter denitrifizierenden Bedingungen lag die Genexpression der *cbb₃* Oxidase 2 in einem mittleren Bereich mit einer bis zu 40.1-fachen Induktion gegenüber aerob gewachsenen Zellen und einer bis zu 3.1-fachen Reprimierung gegenüber mikroaerob gewachsenen Zellen. PA 4133, kodierend für die katalytische Untereinheit CcoN von Cytochrom *c* Oxidasen, war 6.3-fach reprimiert unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen. Es ist bisher nicht bekannt, ob diese Untereinheit die entsprechenden Untereinheiten CcoN1 oder CcoN2 der beiden Cytochrom *c* Oxidasen 1 bzw. 2 ersetzen kann.

Bisherige Untersuchungen von Comolli und Donohue bewiesen eine induzierte *cbb₃* Oxidase 1 Aktivität unter aeroben gegenüber mikroaeroben Bedingungen und eine entgegengesetzte Aktivität der *cbb₃* Oxidase 2 (Comolli und Donohue, 2004), in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten. Es liegen jedoch keine Daten für die Oxidase-Aktivitäten unter denitrifizierenden Bedingungen vor. Eine Promotor-Analyse der beiden Operons ergab eine potentielle Anr-Bindestelle im Promotor der *cbb₃* Oxidase 2, deren Funktionalität von Comolli und Donohue bewiesen wurde. Dies erklärt die beobachtete Induktion der Gene der *cbb₃* Oxidase 2 der beiden Chemostat-Kulturen gegenüber aerob gewachsenen Zellen. Die unterschiedliche Induktion der Gene der *cbb₃* Oxidase 2 denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostat-Kulturen ist jedoch vermutlich nicht auf Anr zurückzuführen, da der Regulator unter beiden Wachstumsbedingungen aktiv ist.

Die Gene der *cbb₃* Oxidase 1 hingegen stehen nicht unter der Kontrolle von Anr. Die vergleichbar starke Induktion dieser Gene sowohl unter aeroben als auch denitrifizierenden Bedingungen sowie die detektierte Induktion gegenüber mikroaerob gewachsenen Zellen verweist auf eine Reprimierung dieser Gene unter mikroaeroben Bedingungen.

Tab. 26: Mittelwerte der Transkriptsignalintensitäten (S) der *cbb₃*-Oxidase-Gene denitrifizierender (DCh) und mikroaerober (MCh) Chemostat-Kulturen sowie aerob gewachsener *batch*-Kulturen (A BK). Ebenfalls angegeben sind die Transkriptionsinduktionen bzw. -reprimierungen der *cbb₃*-Oxidase-Gene denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostatkulturen (DCh vs. MCh) sowie denitrifizierender bzw. mikroaerober Chemostatkulturen gegenüber aerob gewachsener *batch*-Kulturen (DCh vs. A BK bzw. MCh vs. A BK).

Gen	Protein/ Funktion	S A BK	S DCh	S MCh	DCh vs. MCh	DCh vs. A BK	MCh vs. A BK
PA1552	di-Häm Cytochrom <i>c</i> -1	130	79	38	2.0	-1.7	-4.1
PA1553	mono-Häm Cytochrom <i>c</i> -1	180	171	79	2.1	1.0	-2.0
PA1554	katalytische Untereinheit der <i>cbb₃</i> Oxidase 1	296	258	99	2.3	1.1	-2.3
PA1555	di-Häm Cytochrom <i>c</i> -2	19	372	795	-2.5	22.6	54.8
PA1556	mono-Häm Cytochrom <i>c</i> -2	9	259	784	-3.1	40.1	113.4
PA1557	katalytische Untereinheit der <i>cbb₃</i> Oxidase 2	11	122	237	-2.3	9.7	23.4
PA4133	katalytische Untereinheit einer <i>cbb₃</i> -Oxidase	9	70	417	-6.3	8.7	48.5

3.3.1.5 Die Gene der Argininfermentation sind sowohl unter denitrifizierenden als auch mikroaeroben Bedingungen induziert

In Abwesenheit von Sauerstoff und alternativen terminalen Elektronenakzeptoren kann *P. aeruginosa* Energie durch Argininfermentation gewinnen. Hierfür benötigt *P. aeruginosa* das *arcDABC*-Operon, dessen Gene für den Arginin/Ornithin Antiporter ArcD, die Arginindeiminase ArcA, die Carbamoyltransferase ArcB und die Carbatkinase ArcC kodieren. Es ist bekannt, dass das *arc*-Operon unter der positiven Kontrolle der zwei Transkriptionsregulatoren ArgR und Anr steht. ArgR ist gleichzeitig Sensor von Arginin sowie DNA-bindender Transkriptionsaktivator (Lu *et al.*, 1999).

Unter den untersuchten Bedingungen konnte kein Transkript von *argR* detektiert werden, wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit von Arginin im Medium. Somit ist vermutlich allein Anr für die sowohl unter denitrifizierenden als auch mikroaeroben Bedingungen detektierten *arc*-Transkripte verantwortlich (Tab. 27). Die leichte, bis zu 2.4-fache Reprimierung der Gene des *arcDABC*-Operons unter denitrifizierenden Bedingungen könnte auf eine negative Regulation durch Nitrat zurückzuführen sein (Mercenier *et al.*, 1980). Ob dies direkt oder indirekt über NarXL oder einen anderen Regulator vermittelt wird, ist nicht bekannt. Eine Promotoranalyse des *arcDABC*-Operons auf potentielle NarL-Bindesequenzen

(www.prodoric.de) ergab zwei NarL-Bindestellen, von denen eine in der ArgR-Bindesequenz liegt und somit inhibierend auf die ArgR-Bindung an den Promotor wirken könnte.

Insgesamt scheint die Expression der für die Argininfermentation benötigten Gene einer komplexen Regulation unterworfen zu sein. Die Bildung der *arc*-Transkripte in Abwesenheit von Arginin im Medium lässt darauf schließen, dass *P. aeruginosa* Gene verschiedener Energiegewinnungswege induziert, wenn der Sauerstoffpartialdruck unter einen bestimmten Wert fällt. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die durch das unter 3.1 beschriebene Experiment gewonnen wurden (Tab. 11). Hierbei wurden *P. aeruginosa*-Zellen in Minimalmedium unter aeroben Bedingungen bis zu einer $OD_{578} = 0.3$ kultiviert und anschließend in eine anaerobe Kulturflasche überführt. Nach einer zweistündigen Inkubation unter anaeroben Bedingungen wurde die RNA isoliert und einer Transkriptomanalyse unterzogen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in einem Zustand der Adaption auf das anaerobe Milieu. Die primäre Reaktion der Zellen erfolgte aufgrund des Energiestresses, der durch den Entzug des bevorzugten Elektronenakzeptors Sauerstoff verursacht wurde, weshalb das Zellwachstum eingestellt wurde. Gleichzeitig musste sich die Zelle auf das anaerobe Milieu und den alternativen Elektronenakzeptor Nitrat einstellen und geeignete Enzyme synthetisieren (siehe 3.1).

Tab. 27: Transkriptionsinduktionen bzw. -reprimierungen der Argininfermentationsgene denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostatkulturen (DCh vs. MCh), denitrifizierender Chemostatkulturen gegenüber 2h anaerob inkubierter *batch*-Kulturen (DCh vs. D BK) sowie denitrifizierender bzw. mikroaerober Chemostatkulturen gegenüber aerob gewachsener *batch*-Kulturen (DCh vs. A BK bzw. MCh vs. A BK).

Gen	Protein/ Funktion	DCh vs. MCh	DCh vs. D BK	DCh vs. A BK	MCh vs. A BK
PA5170 <i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	-1.4	-8.3	17.4	19.7
PA5171 <i>arcA</i>	arginine deiminase	-2.4	-6.6	7.6	20.0
PA5172 <i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	-2.2	-5.8	11.3	26.9
PA5173 <i>arcC</i>	carbamate kinase	-1.8	-3.5	2.5	5.5

Die Transkription der Gene des *arc*-Operons war in beiden Chemostat-Kulturen gegenüber den zu anaeroben Bedingungen überführten Zellen bis zu 8.3-fach reprimiert. Im Vergleich zu aerob gewachsenen Zellen war die Transkription der *arcDABC*-Gene beider Chemostat-Kulturen jedoch stark induziert, bis zu 17.4-fach in denitrifizierenden und bis zu 26.9-fach in mikroaeroben Chemostat-Kulturen. Die Transkription des *arc*-Operons selbst unter stabilen denitrifizierenden Bedingungen versetzt *P. aeruginosa* in die Lage, schnell auf wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren. Um seinen Energieverbrauch dennoch möglichst gering zu halten, nutzt es vorhandene Umweltreize für weitere Regulationen, wie zum Beispiel die

erwähnte Reprimierung der Transkription der Gene des *arc*-Operons in der Gegenwart von Nitrat. Dieses komplexe Regulationsnetzwerk gewährleistet *P. aeruginosa* eine perfekte Anpassung an Veränderungen in der Verfügbarkeit von Energieressourcen.

3.3.1.6 Regulation Quorum Sensing abhängiger Gene unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen

Quorum Sensing (QS) ist ein unter Bakterien weit verbreiteter globaler Mechanismus zur Kontrolle der Expression von Virulenzfaktoren und der Biofilmentwicklung durch Verwendung kleiner, Zelldichte-abhängiger Signalmoleküle (Fuqua *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1998). In *P. aeruginosa* existieren zwei QS Systeme, das *las* und das *rhl* System. Beide bestehen aus je einem Transkriptionsregulator, LasR bzw. RhlR, und einer Autoinducer-Synthase, LasI bzw. RhII. Letztere katalysieren die Synthese sogenannter acylierter Homoserinlactone, AHLs, welche als kleine, diffundierbare Signalmoleküle wirken. Diese AHLs wiederum binden an ihre entsprechenden Regulatoren, und der dabei gebildete Komplex wirkt als Transkriptionsregulator QS-abhängiger Gene (Passador *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1995).

Die Transkription von *lasR* wird durch Vfr (Albus *et al.*, 1997) und GacA (Reimann *et al.*, 1997) induziert, dessen Genprodukt im Komplex mit seinem zugehörigen AHL die Transkription von *lasI* und *rhlR* positiv reguliert, wodurch es die beiden QS-Systeme miteinander verbindet (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). Das *rhl* QS-System wird weiterhin positiv durch den Zwei-Komponenten-Antwort-Regulator GacA (Reimann *et al.*, 1997) und das *Pseudomonas* Quinolone-Signalmolekül (PQS) (McKnight *et al.*, 2000) sowie negativ durch den Transkriptionsregulator MvaT (Diggle *et al.*, 2002) reguliert.

Die vergleichende Transkriptomanalyse denitrifizierender gegenüber mikroaeroben Chemostat-Kulturen ergab eine 2.2-fache Reprimierung der Transkription des QS-Regulator-Gens *rhlR* unter denitrifizierenden Bedingungen. Die Transkripte der Gene der Regulatoren LasR, GacA und MvaT, unter deren Kontrolle *rhlR* steht, sowie der Gene der beiden Synthasen LasI und RhII, waren unter beiden Bedingungen jedoch gleich stark induziert. Um festzustellen, ob die Reprimierung der *rhlR*-Transkription unter denitrifizierenden Bedingungen unter einem weiteren, bisher unbekannten Regulator steht oder falsch positiv detektiert wurde, wurden die erhaltenen Transkriptomdaten mit den Daten von drei Untersuchungen des *P. aeruginosa*- Transkriptoms in Abhängigkeit der QS-Systeme (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003) verglichen.

Tab. 28: Regulation QS-abhängiger Gene denitrifizierender (DCh) gegenüber mikroaerober (MCh) Chemostat-Kulturen. Die experimentell nachgewiesene QS-Abhängigkeit durch die entsprechenden Forschergruppen ist durch ein „x“ symbolisiert. Die Auflistung von *pqsA*, *phzA2* und *phzA1* erfolgte aufgrund ihrer Position als erstem Gen der entsprechenden Operons, die unter der Kontrolle von LasR/RhlR bzw. Anr liegen und deren nachfolgende Gene stark reguliert waren. Das Transkript von *pqsA* lag für einen Chip unterhalb der Nachweisgrenze. Die Regulation von *phzA2* lag unter dem Grenzwert von 2 und *phzA2-phzB2* sowie *phzC1-phzF2* sind nicht auf dem Microarray vertreten.

Gen	Protein/ Funktion	reguliert durch	DCh vs. MCh	Hentzer <i>et al.</i> (2003)	Schuster <i>et al.</i> (2003)	Wagner <i>et al.</i> (2003)
PA0996 <i>pqsA</i>	probable coenzyme A ligase	LasR/RhlR	-7.9	x	x	x
PA0997 <i>pqsB</i>	probable beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase		-7.1	x	x	x
PA1871 <i>lasA</i>	LasA protease precursor		-4.1	x	x	x
PA1899 <i>phzA2</i>	phenazine biosynthesis protein PhzA	Anr				
PA1901 <i>phzC2</i>	phenazine biosynthesis protein PhzC		-5.7	x		x
PA1903 <i>phzE2</i>	phenazine biosynthesis protein PhzE		-3.3	x		x
PA1904 <i>phzF2</i>	probable phenazine biosynthesis protein		-2.6	x		x
PA2193 <i>hcnA</i>	hydrogen cyanide synthase HcnA	LasR/RhlR	-15.5	x	x	x
PA2195 <i>hcnC</i>	hydrogen cyanide synthase HcnC		-2.6	x	x	x
PA3477 <i>rhlR</i>	transcriptional regulator RhlR		-2.2	x	x	
PA4210 <i>phzA1</i>	probable phenazine biosynthesis protein	LasR/RhlR Anr	-1.9	x	x	
PA4211 <i>phzB1</i>	probable phenazine biosynthesis protein		-7.1	x	x	x
PA0122	putative aegerolysin-like protein		-2.2	x	x	
PA0722	hypothetical protein of bacteriophage Pfl		-2.6			x
PA1323	hypothetical protein		-4.9	x	x	
PA1869	probable acyl carrier protein		-2.8	x	x	x
PA1894	putative 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase		-5.5		x	x
PA1895	hypothetical protein		-2.9		x	x
PA1897	putative SUR2-type hydroxylase/desaturase	LasR/RhlR	-5.3		x	x
PA2747	hypothetical protein		-2.2	x	x	
PA3326	probable Clp-family ATP-dependent protease		-3.6	x	x	
PA3371	hypothetical protein		-2.9	x		
PA3691	hypothetical protein		-2.5	x	x	
PA4133	cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)		-6.3	x	x	
PA4738	putative stress response protein CsbD-like		-2.6		x	
PA4739	putative transport associated protein, BON-domain		-3.2	x	x	
PA5481	hypothetical protein		-5.7	x	x	
PA5482	hypothetical protein		-5.9	x	x	

Insgesamt waren 25 QS-regulierte Gene unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert (Tab. 28). Hierzu gehörten die Gene der beiden Phenanzinbiosynthese-Operons PA1901-1905 und PA4210-4216 (bis zu 7.1-fach), die Gene des HCN-Synthese-Operons *hcnABC* (bis zu 15.5-fach), das Gen kodierend für die LasA Protease (4.1-fach) und die Gene des Operons PA1891-1897 (bis zu 5.5-fach), welche für hypothetische Proteine ohne bekannte Domänenstruktur kodieren. Weiterhin war die Expression von 13 Genen, kodierend für Proteine mit hypothetischer bzw. unbekannter

Funktion, unter denitrifizierenden Bedingungen reprimiert. Bis auf *pqsB*, das Operon PA1892-1897 und das Gen PA4133, steht die Expression genannter Gene entweder unter der alleinigen oder zusätzlichen Kontrolle des RhlR-AHL-Komplexes (Brint und Ohman, 1995; Pessi und Haas, 2000; Schuster *et al.*, 2003).

Gegen eine allgemeine QS-abhängige Regulation spricht zum einen der Zeitpunkt der Zellernte bei einer $OD_{578} = 0.3$, da QS ein bei höheren Zelldichten induzierter Vorgang ist. Des weiteren wurden aus der 77 Gene umfassenden Kerngruppe, die von drei unabhängigen Forschergruppen als QS-abhängig ermittelt wurden (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), nur sechs Gene als unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert analysiert. Dies verweist darauf, dass die in Tab. 28 aufgeführten Gene unter der spezifischen Kontrolle von RhlR-AHL stehen, der seinerseits unter mikroaeroben Umweltbedingungen durch einen unbekannten Regulator moduliert wird. Andererseits könnte dieser zusätzliche Regulator durch DNA-Bindung direkt auf die Transkription einiger Gene einwirken, das die fehlende differentielle Regulation einiger spezifisch von RhlR-AHL induzierbaren Gene/Operons, wie z.B. *rhlAB* (Ochsner und Reiser, 1995) oder *lecA* (Winzer *et al.*, 2000) unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen erklären könnte. Eine Klärung der Frage, ob die Expression dieser Gene durch eine mikroaerobe Umwelt induziert wird, und welche Regulatoren dabei beteiligt sind, wäre aufgrund der Virulenz einiger dieser Genprodukte, z.B. der Protease LasA oder den Zellgiften HCN und Pyocyanin, von klinischem Interesse.

3.3.1.7 Die Transkription der Gene der Typ III Sekretion ist unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen reprimiert

Das Typ III Sekretions-System (TTSS) wird von vielen Gram-negativen pathogenen Bakterien für die Vermittlung ihrer Virulenzfaktoren genutzt (Hueck, 1998). Da das Typ III Sekretionssystem nur in Gegenwart von Wirtszellen, Serum oder in Medium mit niedriger Calcium-Konzentration (Iglewski *et al.*, 1978; Rosqvist *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1980) produziert wird, war die spezifische Expression der Typ III Sekretions-Gene unter mikroaeroben Bedingungen höchst unerwartet (Tab. 29).

Von den vier bekannten Effektoren, die von *P. aeruginosa* durch das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszellen geschleust werden, war einzig die Transkription des Gens kodierend für ExoS 4.8-fach reprimiert unter denitrifizierenden im Vergleich zu mikroaeroben Bedingungen. Transkripte von *exoT*, dessen Genprodukt 0.2 % der ADP-Ribosyltransferase-

Aktivität von ExoS besitzt (Yahr *et al.*, 1996), waren unter mikroaeroben Bedingungen detektierbar, jedoch ohne Induktion gegenüber denitrifizierend gewachsenen Chemostat-Kulturen. Die Transkriptstärke von *exoY*, kodierend für eine Adenylat-Cyclase, deren Intoxikation eukaryontischer Zellen zu erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen führt (Yahr *et al.*, 1998), lag unter mikroaeroben Bedingungen im Rahmen der Nachweisgenauigkeit, so dass keine Regulation postuliert werden kann. Der vierte Effektor, ExoU, ist eine Phospholipase (Sato *et al.*, 2003), die im Mausmodell durch Schädigung des Lungenepithels eine entscheidende Rolle in Atemwegsinfektionen spielt (Finck-Barbancon *et al.* 1997; Allewelt *et al.*, 2000). ExoU wird nur von einigen klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* gebildet, nicht jedoch von dem hier verwendeten Stamm PAO1.

Der Transport dieser Effektoren in die Wirtszelle ist von einem funktionierenden Sekretions-/Translokationskomplex abhängig, der sehr hohe Homologie zum entsprechenden Komplex von *Yersinia spp.* aufweist, dem am besten untersuchten Bakterium in Bezug auf das Typ III Sekretions-System (Frank *et al.*, 1997; Cornelis und Wolf-Watz, 1997). Strukturell gleicht der Typ III Apparat dem Grundkörper der Flagellen, jedoch mit einer Art Injektionsnadel an der Spitze, durch die bei *Yersinia* die drei Proteine YopB, YopD und LcrV sekretiert werden. Diese bilden dann eine mit der Nadelstruktur verbundene Translokationspore durch die Zellmembran des Wirtes, durch die die Antiwirtsfaktoren in die Zelle transloziert werden (Büttner und Bonas, 2002). Für die die Translokationspore bildenden homologen Proteine PopB, PopD und PcrV aus *P. aeruginosa* konnte funktionelle Identität gezeigt werden (Frithz-Lindtsen *et al.*, 1998; Homlström *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 1999). Unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen war die Transkription der zugehörigen Gene des Operons *pcrGVHpopBD* aus *P. aeruginosa* bis zu 15.5-fach reprimiert.

Für die Funktionalität von ExoS ist des weiteren das Chaperon PA3942, ein Homolog zu SycE aus *Yersinia*, notwendig (Wattiau und Cornelis, 1993; Yahr *et al.*, 1995), dessen Transkript unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen 5.3-fach reprimiert war. Seine genaue Funktion ist bisher noch ungeklärt. Denkbar wäre eine Verhinderung der Degradation oder der Faltung von ExoS im bakteriellen Cytosol, um eine Sekretion durch die für gefaltete Proteine zu schmale Sekretions- und Translokationsporen zu gewährleisten. Diskutiert wird ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung der Effektoren durch das TTSS (Isberg und Dumenil, 2001).

Reguliert wird die Transkription von *exoS* sowie der weiteren Gene der für die Sekretion und Translokation benötigten Proteine durch ExsA, einen Transkriptionsregulator der AraC-Familie (Frank und Iglewski, 1991), der an die DNA-Sequenz TNAAAANA mit einer

optimalen Entfernung von 51 bzw. 52 bp vom Transkriptionsstart bindet (Hovey und Frank, 1995). Das zugehörige Gen *exsA* liegt in einem Operon zusammen mit *exsB*, PA1711 und *exsC*, wobei das Gen *exsB* nicht als Protein exprimiert wird, sondern nach Transkription des Operons einen in *cis* agierenden RNA-Bereich bildet, der entweder die Translation von ExsA vermittelt oder die Stabilität der *exsA*-mRNA erhöht (Goranson *et al.*, 1997). Neueste Untersuchungen zeigten, dass ExsC durch Bindung an ExsD als Anti-Anti-Repressor für ExsA fungiert, indem die Bildung des ExsC-ExsD-Komplexes die Bindung von ExsD an ExsA löst, so dass ExsA seine Funktion als Transkriptionsaktivator ausüben kann (Dasgupta *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2002).

Die vergleichende Transkriptomanalyse denitrifizierend gegenüber mikroaerob gewachsener Chemostat-Kulturen ergab eine starke Reprimierung der unter der Kontrolle von ExsA stehenden Operons *exsCBA* (bis zu 6.5-fach) und *pcrGVHpopBD* (bis zu 15.5-fach), sowie der Gene *exoS* und PA3942. Die Transkription von *ExsD* hingegen war nicht reguliert.

Aufgrund der Abwesenheit von Wirtszellen oder Serum wurde getestet, ob die unter mikroaeroben Bedingungen verstärkte Transkription der ExsA-abhängigen Gene auf einen Calciummangel zurückzuführen ist, eventuell verursacht durch einen erhöhten Calciumbedarf der *P. aeruginosa*-Zellen unter denitrifizierenden Bedingungen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Atomabsorptionsanalyse unter Verwendung einer Calcium-Lampe von den Überständen beider Chemostat-Kulturen vorgenommen. Die Atomabsorptionsspektren der Überstände ergaben jedoch eine vergleichbare Konzentration an Ca^{2+} -Ionen, so dass eine durch geringe Ca^{2+} -Konzentration hervorgerufene Induktion des TTSS ausgeschlossen werden kann.

Tab. 29: Gene der Typ III Sekretion, die in denitrifizierend gegenüber mikroaerob gewachsenen *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen reprimiert waren. Die Auflistung von *pcrG* erfolgte aufgrund seiner Position als erstem Gen des entsprechenden Operons, das unter der Kontrolle von ExsA liegt und dessen nachfolgende Gene stark reguliert waren. Die Regulierung des *pcrG*-Transkripts wurde von dem Auswertungsprogramm Microarray Suite 5.0 als nicht reguliert angegeben.

Gen	Protein/ Funktion	reguliert durch	DCh vs. MCh
PA1701	conserved hypothetical protein in type III secretion		-4 . 3
PA1705 <i>pcrG</i>	regulator in type III secretion	ExsA	-2 . 5
PA1706 <i>pcrV</i>	type III secretion protein PcrV		-15 . 5
PA1707 <i>pcrH</i>	regulatory protein PcrH		-5 . 0
PA1708 <i>popB</i>	translocator protein PopB		-5 . 3
PA1709 <i>popD</i>	Translocator outer membrane protein PopD precursor		-3 . 0
PA1710 <i>exsC</i>	exoenzyme S synthesis protein C precursor	ExsA	-6 . 5
PA1711	hypothetical protein		-6 . 1
PA1712 <i>exsB</i>	exoenzyme S synthesis protein B		-3 . 5
PA1713 <i>exsA</i>	transcriptional regulator ExsA		-2 . 2
PA3841 <i>exoS</i>	exoenzyme S	ExsA	-4 . 8
PA3842	probable chaperone	ExsA	-5 . 3

Das Fehlen der bekannten die TTSS-Bildung auslösenden Faktoren (Wirtszellkontakt, Serum oder niedrige Calcium-Konzentration), sowie die unterschiedliche Regulation innerhalb der Gruppe der ExsA-abhängigen Gene, verweist auf einen bisher unbekannten Regulator, der unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen aktiviert wird. Dieser Faktor kann zum einen auf der Transkriptionsebene wirken, indem er spezifisch das *exsCBA*-Operon induziert, so dass gleichzeitig erhöhte Mengen an ExsA und ExsC vorhanden sind. Es ist jedoch auch eine Regulation auf translationaler oder posttranslationaler Ebene denkbar, mit dem Ergebnis einer vermehrten ExsC-Produktion, wodurch vorhandenes ExsD gebunden und somit ExsA freigesetzt wird.

3.3.1.8 Unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen wurden 22 weitere Gene unterschiedlich reguliert

Zusätzlich zu den der Atmung, des Quorum Sensing und des Typ III Sekretionssystems zuteilbaren Genen aus *P. aeruginosa*, deren Transkription unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen unterschiedlich reguliert war, wurde eine unterschiedliche Regulation der Transkription von weiteren 22 Genen detektiert (Tab. 30). Siebzehn dieser Gene kodieren für hypothetische, unbekannte Proteine. Für drei dieser Proteine, die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen bis zu 9.8-fach induziert waren, ergab eine Analyse mittels dem InterProScan des Europäischen Bioinformatischen Instituts (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/index.html?>) eine Peptidasen-Domänenstruktur. Des weiteren befand sich unter den reprimierten Genen *cupA1* (3.4-fach), eine Untereinheit eines Adhesins (Vallet *et al.*, 2001). Untersuchungen von *cupA*-Mutanten durch Vallet *et al.* zeigten die Notwendigkeit des Adhäsins in einem frühen Stadium der Biofilmbildung. Eine verstärkte Bildung von *cupA1*-Transkripten mikroaerober Chemostat-Kulturen deutet auf ein durch eine mikroaerobe Umwelt erhaltenes Signal, das die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* induziert. Obwohl die Gene der weiteren Untereinheiten *cupA2-5* nicht eindeutig reprimiert waren, ist eine falsch positive Zuordnung von *cupA1* aufgrund der Signalstärke seines Transkripts von 1141 unwahrscheinlich.

Eine unterschiedliche Genregulation denitrifizierender und mikroaerober Kulturen wurde des weiteren für *bfrA* und *bfrB* detektiert. *bfrA* und *bfrB* kodieren für Bacterioferritine, die für den Eisenhaushalt von *P. aeruginosa* verantwortlich sind. Weiterhin sind Bacterioferritine Teil des Schutzmechanismus der Zelle gegenüber reaktivem Sauerstoff, indem sie Fe^{2+} binden und teilweise durch ihre Ferroxidase-Aktivität in Fe^{3+} oxidieren (Le Brun *et al.*, 1995). Durch den

Entzug von Fe^{2+} aus dem Cytosol wird die Zell-schädigende Fenton-Reaktion unterbunden. Des weiteren hat zumindest BfrA teil am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, die durch die Atmungskette gebildet werden. Das gebildete Superoxid O_2^- wird zuerst durch die Superoxid-Dismutasen SodM (Mn-haltig) und SodB (Fe-haltig) in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt (Hassett *et al.*, 1993; Hassett *et al.*, 1995). Unter beiden Atmungsbedingungen war die Transkription des Gens *sodB* stark induziert, wohingegen von *sodA* kein Transkript detektiert wurde. Die Umwandlung des Zellgifts Wasserstoffperoxid wird durch die Katalasen KatA und KatB katalysiert, wobei KatB im Gegensatz zu KatA erst bei erhöhten Mengen an H_2O_2 induziert wird (Hassett *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995). Dementsprechend waren unter beiden Wachstumsbedingungen allein Transkripte von *katA* detektierbar. KatA wiederum benötigt eine prosthetische Häm-Gruppe, die ihr Eisen vermutlich von BfrA enthält (Ma *et al.*, 1999).

Interessanterweise fand unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen eine Induktion der Transkription des Gens *bfrA* sowie eine Reprimierung der Transkription von *bfrB* statt. Die Promotoranalyse der Gene *bfrA* und *bfrB* ergab eine hypothetische Anr-Bindestelle im Promotorbereich von *bfrA* (siehe 3.1.6.2). Dies ist sowohl im Einklang mit den Ergebnissen der Transkriptomanalysen der Chemostat-Kulturen als auch unter Hinzunahme der Transkriptomanalysen der aeroben und zu anaeroben Bedingungen überführten *batch*-Kulturen (siehe 3.1). Demnach übernimmt sowohl unter aeroben als auch mikroaeroben Bedingungen BfrB die Aufgabe des Eisenhaushalts, wohingegen BfrA diese Aufgabe unter denitrifizierenden Umweltbedingungen übernimmt. Interessanterweise scheint BfrB auch in Stresssituationen benötigt zu werden, da nach einer zweistündigen anaeroben Induktion eine verstärkte Transkription von *bfrB* sowohl gegenüber aeroben als auch denitrifizierenden oder mikroaeroben Bedingungen auftrat. Die Transkriptmenge an *bfrA*-mRNA nach zweistündiger anaerober Induktion hingegen glich dem Wert unter denitrifizierenden Bedingungen.

Dies verweist auf unterschiedliche Aufgabengebiete bzw. unterschiedliche Interaktionspartner der beiden Bacterioferritine. Ein unterschiedlicher Reaktionspartner wurde mit KatA bereits vorgestellt (Ma *et al.*, 1999). Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Transkription der Gene *katA* und *sodB* denitrifizierender gegenüber mikroaerober Chemostat-Kulturen festgestellt werden. Ob BfrA tatsächlich die Häm-Gruppe von KatA mit Eisen versorgt und somit für eine posttranslationale Regulation der KatA-Aktivität mitverantwortlich ist, könnte durch Aktivitätstests denitrifizierender und mikroaerober Kulturen überprüft werden.

Tab. 30: Differentielle Regulation von Genen in denitrifizierenden (DCh) gegenüber mikraeroben (MCh) *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen, die weder dem Energiestoffwechsel, dem QS oder dem Typ III Sekretionssystem zugeordnet werden konnten.

Gen	Protein/ Funktion	reguliert durch	DCh vs. MCh
PA0141	conserved hypothetical protein	Anr	-2.5
PA0224	putative class II aldolase	Dnr	6.3
PA0614	hypothetical protein		3.0
PA0627	putative phage tail X domain		2.4
PA0633	hypothetical protein		2.1
PA0723 <i>coaB</i>	coat protein B of bacteriophage Pf1		-12.3
PA2128 <i>cupA1</i>	fimbrial subunit CupA1		-3.4
PA2322	putative gluconate permease		2.2
PA2663	putative peptidase		2.2
PA2780	putative transcriptional regulator		-3.4
PA3205	hypothetical protein		2.2
PA3531 <i>bfrB</i>	bacterioferritin		-3.7
PA3911	putative sterol-binding domain		5.0
PA3912	putative peptidase U32		9.8
PA3913	putative peptidase U32	Anr	8.6
PA3915 <i>moaB1</i>	molybdopterin biosynthetic protein B1		13.0
PA3917 <i>moaD</i>	molybdopterin converting factor, small subunit		2.6
PA4235 <i>bfrA</i>	bacterioferritin	Anr	2.4
PA4607	hypothetical protein		-2.2
PA4610	hypothetical protein	Anr	4.4
PA5496	hypothetical protein		3.0
PA5497	putative ribonucleotide reductase, large subunit	Anr	3.4

3.3.2 Vergleichende Proteomanalyse denitrifizierender gegenüber mikraeroben Chemostat-Kulturen

Die Auswirkungen unterschiedlicher Atmungsbedingungen auf *P. aeruginosa* wurden zusätzlich zur Transkriptomanalyse mittels der vergleichenden Proteomanalyse ermittelt (Abb. 27). Um beide Datensätze gut miteinander vergleichen zu können, wurden sowohl für die Transkriptom- als auch für die Proteomanalyse Zellen verwendet, die gleichzeitig aus den jeweiligen Chemostat-Kulturen entnommen worden waren. Der limitierende Faktor beider Chemostat-Kulturen war wie bereits unter 3.3.1 erwähnt der jeweilige terminale Elektronenakzeptor. Für die Proteomanalyse wurden 2D-Gelelektrophoresen von Gesamt-Zell-Lysaten durchgeführt und mittels des Analyse-Programms Z3 (Compugen, Tel Aviv, Israel) miteinander verglichen. Unterschiede in der Spotintensität wurden als signifikant gewertet, deren relative Expression (RE) entweder unter -2 oder über 2 lagen. Es wurden durch diese vergleichende Proteomanalyse 24 unterschiedlich regulierte Proteine detektiert, von denen in denitrifizierenden gegenüber mikraeroben Chemostat-Kulturen 15

hochreguliert und neun reprimiert waren. Alle diese 24 Proteine wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Tabelle 31 zeigt die n-fache Induktion bzw. Reprimierung der regulierten Proteine sowie die Expressionsdaten ihrer zugehörigen Gene, analysiert mittels Microarray-Analyse.

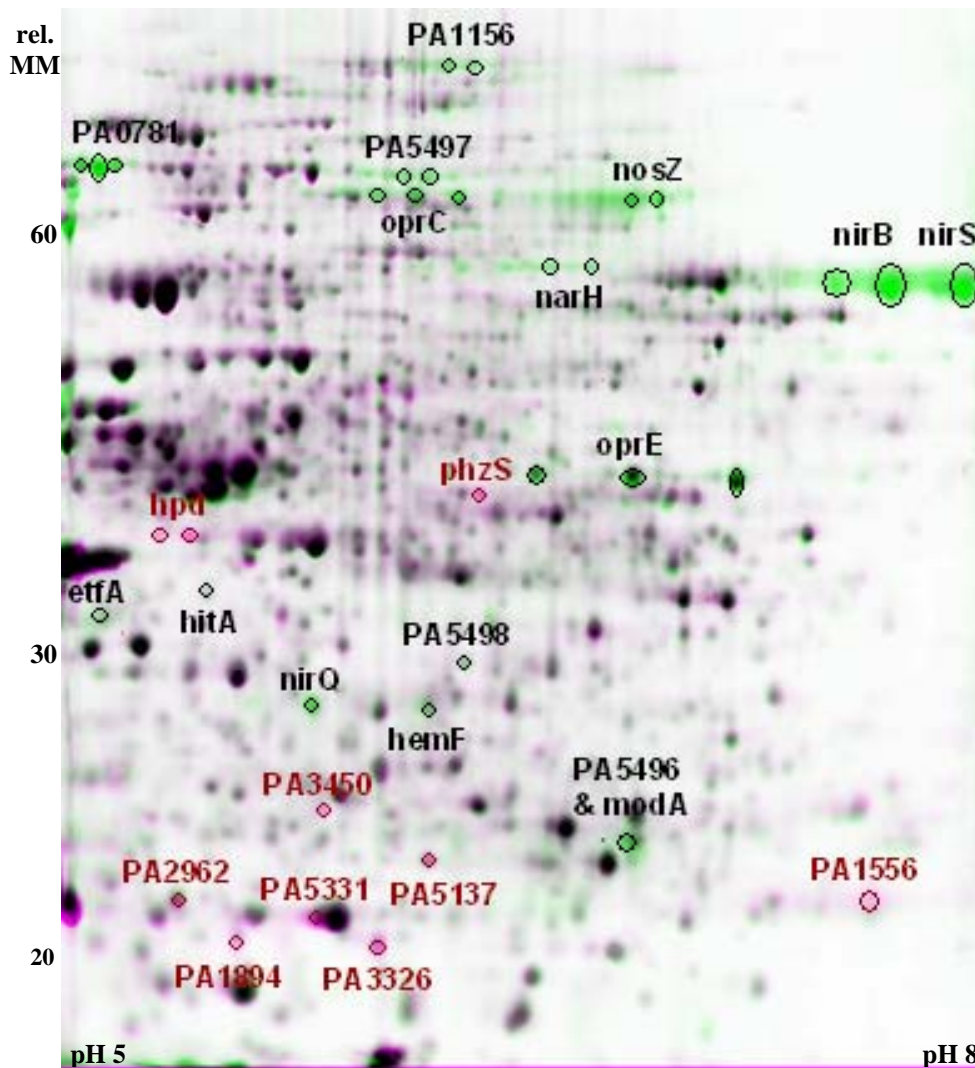


Abb. 27: Das differentielle Proteom denitrifizierender und mikroaerober *P. aeruginosa*-Chemostat-Kulturen. Die Bakterien-Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit 20 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und 50 mM Nitrat bzw. Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese, die Auswertung unter Verwendung der Software Z3 (Compugen). Grüne Spots zeigen die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen vermehrt gebildeten Proteine an, rote Spots die unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen geringer gebildeten Proteine, und schwarze Spots markieren nicht-regulierte Proteine.

Unter denitrifizierenden Bedingungen induziert waren Proteine die zur Nitratatmungskaskade gehören, wie z.B. die β -Kette der Nitratreduktase NarH, die Nitritreduktase NirS, die Distickstoffmonoxid-Reduktase NosZ, sowie der posttranslational wirkende Regulator NirQ. Des weiteren gehören zu dieser Gruppe von unter denitrifizierenden Bedingungen induzierten

Proteinen NirB, die große Untereinheit der assimilatorischen Nitritreduktase, EtfA, die alpha-Untereinheit des Elektronentransfer Flavoproteins Etf sowie zwei Porine der äußeren Membran, OprC und OprE.

Zu den Proteinen, die in denitrifizierenden gegenüber mikroaerob gewachsenen Kulturen in geringerer Menge gebildet wurden, gehören die Monohäm-Untereinheit der *cbb₃* Oxidase 1 (PA1556), PhzS, eine Flavin-haltige Monooxygenase, des weiteren ein Protein mit einer zur 2-Oxoglutarat- und Fe(II)-abhängigen (Di)Oxygenase Superfamilie gehörenden Domänenstruktur (PA1894), Hpd, eine 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase sowie ein hypothetisches Protein mit einer Alkylhydroperoxidreduktase bzw. Thiol-spezifischen Antioxidans-Domänenstruktur (PA3450). Die Induktion antioxidierender Agentien unter mikroaeroben Bedingungen könnte für die Funktionalität von Anr, das durch molekularen Sauerstoff deaktiviert wird, sowie weiterer Sauerstoff-labiler Proteine von Bedeutung sein.

Tab. 31: Darstellung der unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen regulierten Proteine unter Angabe des verantwortlichen Regulators sowie der Stärke der Regulation (DCh vs MCh) unter Verwendung sowohl der Proteomanalyse als auch der Transkriptomanalyse. Ein mittels der Proteomanalyse untersuchter Proteinspot, der nur auf einem Gel detektiert wurde, ist durch „um“ (*unmatched*) symbolisiert. Gene, deren Transkripte unter Verwendung der Transkriptomanalyse nicht detektiert wurden, sind als A (*absent*) dargestellt und Gene, deren Transkription unter den getesteten Bedingungen nicht reguliert war, sind als NC (*not changed*) angegeben.

Gen	Protein/ Funktion	reguliert durch	Proteom-analyse	Transkriptom-analyse
PA0024 <i>hemF</i>	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	Anr	3 . 0	A
PA0291 <i>oprE</i>	Anaerobically-induced outer membrane porin		6 . 7	A
PA0519 <i>nirS</i>	nitrite reductase	Anr	50 . 0	19 . 4
PA0520 <i>nirQ</i>	regulatory protein	Anr	20 . 0	8 . 1
PA0781	putative TonB-dependent receptor		33 . 3	NC
PA0865 <i>hpd</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Anr	um	A
PA1156 <i>nrdA</i>	ribonucleoside reductase, large chain		20 . 0	NC
PA1556	mono-Häm Cytochrom c-2	Anr	-453 . 4	-3 . 1
PA1781 <i>nirB</i>	assimilatory nitrite reductase large subunit		um	A
PA1863 <i>modA</i>	molybdate-binding periplasmic protein precursor	Anr	2 . 1	NC
PA1894	putative 2OG(oxoglutarate)-Fe(II) oxygenase		-9 . 2	-5 . 5
PA2951 <i>etfA</i>	electron transfer flavoprotein alpha-subunit		2 . 1	NC
PA2962 <i>tmk</i>	thymidylate kinase		-2 . 1	A
PA3326	putative Peptidase S14		-9 . 3	-3 . 6
PA3392 <i>nosZ</i>	nitrous-oxide reductase precursor	Anr	50 . 0	35 . 5
PA3450	putative Alkyl hydroperoxide reductase		-10 . 1	A
PA3790 <i>oprC</i>	Putative copper transport outer membrane porin		um	A
PA3874 <i>narH</i>	respiratory nitrate reductase beta chain	Anr	um	24 . 7
PA4217 <i>phzS</i>	flavin-containing monooxygenase		-47 . 5	-3 . 0
PA5137	putative solute-binding protein		-2 . 9	A
PA5331	putative orotate phosphoribosyltransferase		um	A
PA5496	hypothetical protein		2 . 1	3 . 0
PA5497	putative ribonucleotide reductase, large subunit	Anr	25 . 0	3 . 4
PA5498	putative periplasmic solute binding protein		4 . 3	A

Insgesamt waren zehn der 24 unterschiedlich exprimierten Proteine gleichermaßen transkriptionell reguliert, vier weitere konnten in beiden Transkriptomdatensätzen detektiert werden, waren jedoch auf RNA-Ebene nicht reguliert und von den restlichen zehn konnten keine Transkripte detektiert werden. Während bei der Proteomanalyse die Auswirkungen sowohl der transkriptionellen als auch der translationalen sowie posttranslationalen Regulation detektiert werden, dienen Transkriptomanalysen hauptsächlich der Aufklärung von Regulationsnetzwerken. Andererseits können Microarray-Analysen Datensätze über den mRNA-Level jedes *open reading frames* liefern, somit auch derjenigen, die für Membranproteine kodieren, die nicht durch herkömmliche 2D-PAGE detektiert werden können. Dies ist einer der Gründe, warum von nur 11 % der unterschiedlich regulierten Gene die zugehörigen Proteine durch vergleichende Proteomanalyse detektiert werden konnten. Andererseits können die als differentiell reguliert detektierten Proteine, deren zugehörige Gene keiner unterschiedlichen Regulation unterworfen waren, Hinweise auf eventuelle posttranslationale Regulationen liefern. Insgesamt konnten zu 42 % der regulierten Proteine auch deren zugehörigen Gene mittels Transkriptomanalyse als reguliert detektiert werden. Zumindest in Bezug auf Unterschiede in der Respiration konnten mittels GeneChip Analysen somit interessante Hinweise auf die Regulation der Gene sowie ausführenden Enzyme erlangt werden.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung des anaeroben Regulons von *P. aeruginosa* die Versuchsbedingungen sowie die Durchführung und Auswertung von *P. aeruginosa* GeneChips etabliert. Mittels der vergleichenden Transkriptomanalyse anaerob gegenüber aerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen konnten 166 induzierte und 247 reprimierte Gene identifiziert werden, mit einem Induktionsmaximum von 150-fach, gegenüber einem Repressionsmaximum von nur 10-fach. Die anaerob regulierten Gene kodierten zu 13 % für Proteine, die dem Energiemetabolismus zugehören. Zu 33 % war die Transkriptionsregulierung vermutlich eine Reaktion auf den durch anaerobe Kultivierung zuvor aerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen verursachten Energiemangel, wohingegen die Regulierung weiterer 23 % eine direkte Reaktion auf den Sauerstoffmangel widerspiegelte. Weitere 31 % der regulierten Gene kodierten für hypothetische Proteine. Die Regulation der zehn unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen am stärksten induzierten Operons wurde mittels Promotoranalysen unter Verwendung von Reporterfusionen bestätigt.

Die Untersuchung des Anr-Dnr-Regulons mittels der vergleichenden Transkriptomanalyse anaerob induzierter *anr*- und *dnr*-Mutanten sowie *P. aeruginosa* Wildtyp Zellen ergab 66 Gene, die unter der positiven Kontrolle der beiden Regulatoren Anr (57) und Dnr (9) stehen. Für 28 dieser Gene konnte mit Hilfe einer *weight matrix* Analyse eine hypothetische Anr-Bindesequenz in den zugehörigen potentiellen Promotorregionen detektiert werden, von denen 21 noch nicht in der Literatur beschrieben sind.

Des weiteren wurden 13 Gene detektiert, die unter anaeroben gegenüber aeroben Bedingungen unter der negativen Kontrolle der beiden Regulatoren Anr und Dnr stehen. Aufgrund einer fehlenden hypothetischen Anr-Box sowohl in den potentiellen Promotorregionen als auch in den Genen selbst scheint diese Anr- bzw. Dnr-Abhängigkeit jedoch indirekter Art zu sein.

Die differentielle Transkriptomanalyse anaerob gegenüber aerob gewachsener *P. aeruginosa* Zellen verwies auf 30 unterschiedlich regulierte potentielle Regulorgene, von denen 16 anhand ihrer Insertionsmutanten phänotypisch untersucht wurden, 12 davon in der vorliegenden Arbeit. Von diesen Regulatoren zeigte einzig die Insertionsmutante DHpa3757 ein signifikant reduziertes Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen. Eine differentielle Proteomanalyse dieser Mutante verweist auf eine Beteiligung des hypothetischen, eine GntR-Domäne besitzenden Regulators PA3757 an der Regulation der

Glucoseaufnahme über die Regulation der Porine OprB und PA2291 sowie eines hypothetischen ABC Zucker-Transporters (PA3187-3190) über dessen Bindeprotein PA3190.

Zur weiteren Charakterisierung des Anr-Regulons wurden *P. aeruginosa* Chemostat-Kulturen unter mikroaeroben und denitrifizierenden Bedingungen kultiviert und diese sowohl einer differentiellen Transkriptom- als auch Proteomanalyse unterzogen. Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnten 94 unterschiedlich regulierte Gene detektiert werden, die zu 29 % dem Energiestoffwechsel zugeordnet werden konnten. In denitrifizierenden Chemostat-Kulturen reprimiert transkribierte Gene konnten vor allem dem Quorum Sensing (25) und dem Typ III Sekretionssystem (11) zugeordnet werden.

Für 43 der transkribierten Gene bzw. Operons konnte eine potentielle Anr-Bindestelle in den entsprechenden hypothetischen Promotorregionen identifiziert werden, von denen zwanzig unter den getesteten Wachstumsbedingungen nicht unterschiedlich reguliert waren. Die Transkription von 18 Genen bzw. Operons mit einer hypothetischen Anr-Bindestelle war unter denitrifizierenden gegenüber mikroaeroben Bedingungen induziert, wohingegen eine Transkriptionsreprimierung nur für fünf Gene detektiert werden konnte. Eine differentielle Regulation über die Stärke der Konservierung der Anr-Bindesequenz konnte ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe der Proteomanalyse konnten 24 differentiell regulierte Proteine identifiziert werden, darunter die unter denitrifizierenden Bedingungen vermehrt gebildeten Proteine der Denitrifikation sowie die Porine OprC und OprE. Unter denitrifizierenden Bedingungen reprimiert waren vor allem potentielle Oxygenasen, die vermutlich Sauerstoff-labilen Proteinen Schutz in einem mikroaeroben Milieu bieten.

Ein Vergleich der Transkriptom- und Proteomanalysen ergab eine 42 %ige Übereinstimmung der Transkriptomdaten mit den Proteomdaten in Hinsicht auf regulierte Proteinbildung, allerdings konnte nur für 11 % der transkriptionell regulierten Gene ebenfalls eine Regulation auf Proteinebene detektiert werden. Gründe hierfür liegen einerseits in posttranskriptioneller Regulation und andererseits an den Grenzen der hier verwendeten 2D-PAGE, mittels der weder membranständige Proteine noch Proteine mit pI-Werten außerhalb eines pH-Wertes von 5-8 detektiert werden können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten können die Grundlage für die Aufklärung des komplexen Regulationsnetzwerkes für die Umstellung von aerober über mikroaerophiler zu anaerober Lebensweise von *P. aeruginosa* bilden und so zentrale Prozesse der Biofilmbildung und Infektion auf molekularer Ebene verständlich machen.

5 Ausblick

Die mittels differentieller Transkriptom- und Proteomanalyse aerober, mikroaerober und denitrifizierender *P. aeruginosa* Kulturen gewonnenen Daten bieten eine breitgefächerte Grundlage für vielfältige weiterführende Studien:

- Bestimmung des Einflusses der Nukleotide an den Positionen 7 und 8 des Anr-Sequenzlogos auf die Anr-DNA-Bindungsstärke
- Aufgabe der unter anaeroben Bedingungen induzierten potentiellen Stressproteine
- Aufklärung des Anr-Dnr-Regulons unter Fermentationsbedingungen
- Aufklärung weiterer anaerober regulatorischer Netzwerke anhand der 16 Regulatormutanten
- Untersuchung des potentiellen Regulators PA3757 auf seine Rolle im anaeroben Glucosehaushalt mittels Reportergenfusionen der Promotoren der Gene OprB, PA2291 und PA3190
- Aufklärung der gegenläufigen Regulation der zwei Cytochrom *cbb*₃-Oxidasen unter denitrifizierenden und mikroaeroben Bedingungen
- Aufklärung der gegenläufigen Regulation der beiden Bacterioferritine BfrA und BfrB
- Bestimmung des Signals und potentiell beteiligter Regulatoren für die Transkriptionsinduktion QS-abhängiger Gene unter mikroaeroben Bedingungen
- Aufklärung des Signals der Typ III Sekretion unter mikroaeroben Bedingungen
- Klärung der Frage, ob ein mikroaerobes Milieu eine der Voraussetzungen der Pathogenität von *P. aeruginosa* ist

6. Literaturverzeichnis

- Aebi, C., Bauernfeind, A., Döring, G., Przyklenk, B., Schneider, I. & Schöni M.H. (2001) Mikrobiologie. In: Cystische Fibrose: 74-119. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Aiba, H., Adhya, S. & de Crombrughe, B. (1981) Evidence for two gal promoters in intact *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**: 11905-11910.
- Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E. & Iglewski, B.H. (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3928-3935.
- Allewelt, M., Coleman, F.T., Grout, M., Priebe, G.P. & Pier, G.B. (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* **68**: 3998-4004.
- Arai, H., Sanbogi, Y., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1990) Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome *c*₅₅₁ from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **261**: 196-198.
- Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1994) Structure and ANR-dependent transcription of the *nir* genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotech Biochem* **58**: 1286-1291.
- Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995) Expression of *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett* **371**: 73-76.
- Arai, H., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **25**: 1141-1148.
- Arai, H., Mizutani, M. & Igarashi, Y. (2003) Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 29-36.
- Arvidsson, R.H.A., Nordling, M. & Lundberg, L.G. (1989) The azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization. *Eur J Biochem* **179**: 195-200.
- Au, D.C. & Gennis, R.B. (1987) Cloning of the *cyo* locus encoding the cytochrome *o* terminal oxidase complex of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 3237-3242.
- Augier, V., Guigliarelli, B., Asso, M., Bertrand, P., Frixon, C., Giordano, G., Chippaux, M. & Blasco, F. (1993) Site-directed mutagenesis of conserved cysteine residues within the β -subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of the mutated enzymes. *Biochemistry* **32**: 2013-2023.

- Bakay, M., Chen, Y.W., Borup, R., Zhao, P., Nagaraju, K. & Hoffman, E. P. (2002)** Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics* **3**: 4.
- Ballard, A.L. & Ferguson, S.J. (1988)** Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence for two *b*-type haems in the τ -subunit and properties of a water-soluble active enzyme containing α and β subunits. *Eur J Biochem* **174**: 207-212.
- Bear, C.E., Li, C.H., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeesingh, M. & Riordan, J.R. (1992)** Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**: 809-818.
- Becher A. & Schweizer, H.P. (2000)** Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* **29**: 948-954.
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W.B. & Richardson, D.J. (1995)** Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* **1232**: 97-173.
- Braun, C. & Zumft, W.G. (1991)** Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 22785-22788.
- Brint, J.M. & Ohman, D.E. (1995)** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**: 7155-7163.
- Brown, S.M., Howell, M.L., Vas, M.L., Anderson, A. & Hassett, D.J. (1995)** Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol* **177**: 6536-6544.
- Büttner, D. & Bonas, U. (2002)** Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**: 5313-5322.
- Carlson, C.A. & Ingraham, J.L. (1983)** Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1247-1253.
- Canters, G.W. (1986)** The azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa* codes for a pre-protein with a signal peptide. *FEBS Lett* **212**: 168-172.

- Chen, Y.W., Zhao, P., Borup, R. & Hoffman, E.P. (2000)** Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* **151**: 1321-1336.
- Comolli, J.C. & Donohue, T.J. (2004)** Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb₃* cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**: 1193-1203.
- Cooper, M., Tavankar, G.R. & Williams, H.D. (2003)** Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 1275-1284.
- Corin, A.F., Bersohn, R. & Cole, P.E. (1983)** pH dependence of the reduction-oxidation reaction of azurin with cytochrome *c*₅₅₁ : role of histidine-35 of azurin in electron transfer. *Biochemistry* **22**: 2032-2038.
- Cornelis, G.R. & Wolf-Watz, H. (1997)** The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Cotter, P.A. & Gunsalus, R.P. (1989)** Oxygen, nitrate, and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 3817-3823.
- Crack, J., Green, J. & Thomson, A.J. (2004)** Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**: 9278-9286.
- Crawford, M.J. & Goldberg, D.E. (1998)** Role for the Salmonella flavohemoglobin in protection from nitric oxide. *J Biol Chem.* **273**: 12543-12547.
- Cunningham, L., Pitt, M. & Williams, H.D. (1997)** The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome bd quinol oxidases. *Mol Microbiol* **24**: 579-591.
- Cuypers, H., Viebrock-Sambale A. & Zumft, W.G. (1992)** NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **174**: 5332-5339.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C. & Yahr, T.L. (2004)** A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**: 297-308.
- Darwin, A.J. & Stewart, V. (1995)** Nitrate and nitrite regulation of the Fnr-dependent *aeg-46.5* promoter of *Escherichia coli* K-12 is mediated by competition between homologous response regulators (NarL and NarP) for a common DNA-binding site. *J Mol Biol* **251**: 15-29.

- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- de Kievit, T., Seed, P.C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B.H. (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 2175-2184.
- de Lorenzo, V. & Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- Diggle, S.P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. (2002) Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**: 2576-2586.
- Drazek, E.S., Stein, D.C. & Deal, C.D. (1995) A mutation in the *Neisseria gonorrhoeae* *rfaD* homolog results in altered lipooligosaccharide expression. *J Bacteriol* **177**: 2321-2327.
- Duchene, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B.U. & Domdey, H. (1988) Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. *J Bacteriol* **170**: 155-162.
- Dunn, N.W. & Holloway, B.W. (1971) Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res* **18**: 185-197.
- Ellfolk, N., Ronnberg, M. & Osterlund, K. (1991) Structural and functional features of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **1080**: 68-77.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**: 4596-4604.
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 177-198.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D.W. (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* **25**: 547-557.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. & Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**: 767-773.

- Foote, N., Turner, R., Brittain, T. & Greenwood, C. (1992)** A quantitative model for the mechanism of action of the cytochrome *c* peroxidase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **283**: 839-843.
- Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M. & Giuffrè, A. (2001)** The cytochrome *cbb₃* from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *Eur J Biochem* **268**: 6486-6491.
- Frank, D.W. & Iglewski, B.H. (1991)** Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 6460-6468.
- Frank, D.W. (1997)** The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**: 621-629.
- Frithz-Lindsten, E., Holmström, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R. & Forsberg, A. (1998)** Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**: 1155-1165.
- Frunzke, K., Heiss, B., Meyer, O. & Zumft, W.G. (1993)** Molybdopterin guanine dinucleotide is the organic moiety of the molybdenum cofactor in respiratory nitrate reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiol Lett* **113**: 241-245.
- Fülöp, V., Ridout, C.J., Greenwood, C. & Hajdu, J. (1995)** Crystal structure of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* **3**: 1225-1233.
- Fujita, Y. & Fujita, T. (1987)** The gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4524-4528.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P. (1994)** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
- Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A. & Haas, D. (1991)** Positive Fnr-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 1598-1606.
- Gamper, M., Zimmermann, A. & Haas, D. (1991)** Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 4742-50.
- Gamper, M., Ganter, B., Polito, M.R. & Haas, D. (1992)** RNA processing modulates the expression of the *arcDABC* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **226**: 943-957.

- Ganesan, A.K., Mende-Mueller, L., Selzer, J. & Barbieri, J.T. (1999)** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a double ADP-ribosyltransferase, resembles vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem* **274**: 9503-9508.
- Goehring, U.M., Schmidt, G., Pederson, K.J., Aktories, K. & Barbieri, J.T. (1999)** The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**: 36369-36372.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Patutschnick, W. & Cleve, H. (1985)** Improved resolution of PI (alpha 1-antitrypsin) phenotypes by a large-scale immobilized pH gradient. *Am J Hum Genet* **37**: 922-930.
- Goranson, J., Hovey, A.K. & Frank, D.W. (1997)** Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 1646-1654.
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J. & Guest, J.R. (1996)** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in Fnr and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem J* **316**: 887-892.
- Grunberg-Manago, M. (1999)** Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**: 193-227.
- Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Bertrand, P., Frixon, C., Giordano, G. & Blasco, F. (1996)** Complete coordination of the four Fe-S-centers of β subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutants lacking the highest or lowest potential [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* **35**: 4828-4836.
- Haas, D., Gamper, M. & Zimmermann, A., (1992)** Anaerobic control in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology*: 177-187. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Härtig, E. & Zumft, W.G. (1999)** Kinetics of *nirS* expression (cytochrome *cd₁* nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. *J Bacteriol* **181**: 161-166.
- Hahn-Falke-Klein (1994)** Pseudomonaden. In: *Medizinische Mikrobiologie, Kapitel 8*: 343-349.
- Hasegawa, N., Arai, H. & Igarashi, Y. (2001)** Two *c*-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 1223-1230.

- Hassett, D.J., Charniga, L., Bean, K.A., Ohman, D.E. & Cohen, M.S. (1992) Antioxidant defense mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the redox-active antibiotic pyocyanin and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun* **60**: 328-336.
- Hassett, D.J., Woodruff, W.A., Wozniak, D.J., Vasil, M.L., Cohen, M.S. & Ohman, D.E. (1993) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J Bacteriol* **175**: 7658-7665.
- Hassett, D.J., Schweizer, H.P. & Ohman, D.E. (1995) *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J Bacteriol* **177**: 6330-6337.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S.V., Rowe, J.J., Sun Yoon, S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R. & Ochsner, U.A. (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* **54**: 1425-1443.
- Haydon, D.J. & Guest, J.R. (1991) A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol Lett* **63**: 291-295.
- Heldt, D. (2003) Regulation of the anaerobic metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Universität Braunschweig.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. & Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**: 3803-3815.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. & Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86.
- Hoiby, N. (1993) Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung. *Annu Rev Med* **44**: 1-10.

- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., Benz, R., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**: 620-632.
- Horio, T. (1958) Terminal oxidation system in bacteria. *J Biochem* **45**: 195-205.
- Hovey, A.K. & Frank, D.W. (1995) Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **177**: 4427-4436.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Hungerer, C., Troup, B., Römling, U. & Jahn, D. (1995) Regulation of *hemA* gene during 5-aminolevulinic acid formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**: 1435-1443.
- Hussain, H., Grove, J., Griffiths, L., Busby, S. & Cole, J. (1994) A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Mol Microbiol* **12**: 153-163.
- Iglewski, B.H., Sadoff, J., Bjorn, M.J. & Maxwell, E.S. (1978) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3211-3215.
- Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L. & Riordan, J.R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**: 129-135.
- Jin, H., Thomann, H., Coyle, C.L. & Zumft, W.G. (1989) Copper coordination in nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *J Am Chem Soc* **111**: 4262-4269.
- Kaiser, M. & Sowers, G. (1995) Nitrate repression of the *Escherichia coli* *pfl* operon is mediated by the dual sensors NarX and NarY and the dual regulators NarL and NarP. *J Bacteriol* **177**: 3647-3655.
- Kalman, L. & Gunsalus, R.P. (1988) The *frdR* gene of *Escherichia coli* globally regulates several operons involved in anaerobic growth in response to nitrate. *J Bacteriol* **170**: 623-629.
- Kalman, L. & Gunsalus, R.P. (1989) Identification of a second gene involved in global regulation of fumarate reductase and other nitrate-controlled genes for anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 3810-3816.
- Kawasaki, S., Arai, H., Igarashi, Y., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1997) Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme *d₁* biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 235-242.

- Khoroshilova, N., Beinert, H. & Kiley, P. (1995)** Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant Fnr protein enhances DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2499-2503.
- Klose, J. (1975)** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**: 231-243.
- Knowles, M.R. & Boucher, R.C. (2002)** Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **109**: 571-577.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K.J. & Barbieri, J.T. (2002)** In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun* **70**: 360-367.
- Krieger, R. (2001)** Transkriptionelle Kontrolle der Denitrifikation in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Universität Freiburg.
- Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. & Jahn, D. (2002)** The *Pseudomonas aeruginosa* *hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol Genet Genomics* **267**: 409-417.
- Kroneck, P.M.H., Antholine, W.A., Riester, J. & Zumft, W.G. (1988)** The cupric site in nitrous oxide reductase contains a mixed-valence [Cu(II), Cu(I)] binuclear center: a multifrequency electron paramagnetic resonance investigation. *FEBS Lett* **242**: 70-74.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. & Nystrom, T. (2003)** The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol* **6**: 140-145.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996)** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C. und Kiley, P.J. (1996)** DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR proteien from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* **271**: 2762-2768.
- Le Brun, N.E., Andrews, S.C., Guest, J.R., Harrison, P.M., Moore, G.R. & Thomson, A.J. (1995)** Identification of the ferroxidase centre of *Escherichia coli* bacterioferritin. *Biochem J* **312**: 385-392.
- Lessie, T.G. & Phibbs, P.V. Jr. (1984)** Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**: 359-388.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R. & Lockhart, D.J. (1999)** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**: 20-24.

- Lu, C.D., Winteler, H., Abdelal, A. & Haas, D. (1999)** The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 2459-2464.
- Lüthi, E., Mercenier, A. & Haas, D. (1986)** The *arcABC* operon required for fermentative growth of *Pseudomonas aeruginosa* on arginine: Tn5-751-assisted cloning and localization of structural genes. *J Gen Microbiol* **132**: 2667-2675.
- Ma, J.F., Ochsner, U.A., Klotz, M.G., Nanayakkara, V.K., Howell, M.L., Johnson, Z., Posey, J.E., Vasil, M.L., Monaco, J.J. & Hassett, D.J. (1999)** Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 3730-3742.
- Mandon, K., Kaminski, P.A. & Elmerich, C. (1994)** Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J Bacteriol* **176**: 2560-2568.
- McCaw, M.L., Lykken, G.L., Singh, P.K. & Yahr, T.L. (2002)** ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* **46**: 1123-1133.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H. & Pesci, E.C. (2000)** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 2702-2708.
- Mercenier, A., Simon, J.P., Vander Wauven, C., Haas, D. & Stalon, V. (1980)** Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **144**: 159-163.
- Miller, J.H. (1992)** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Moore, G.R., Kadir, F.H., al-Massad, F.K., Le Brun, N.E., Thomson, A.J., Greenwood, C., Keen, J.N. & Findlay, J.B. (1994)** Structural heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* bacterioferritin. *Biochem J* **304**: 493-497.
- Moreno-Vivian, C. & Ferguson, S.J. (1998)** Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol Microbiol* **29**: 664-666.
- Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. & Castillo, F. (1999)** Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* **181**: 6573-6584.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. & Jahn, D. (2003)** PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* **31**: 266-269.

- Myllykallio, H. & Liebl, U. (2000)** Dual role for cytochrome *cbb₃* oxidase in clinically relevant proteobacteria? *Trends Microbiol* **8**: 542-543.
- Nichols, N.N. & Harwood, C.S. (2000)** An aerotaxis transducer gene from *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 177-183.
- O'Farrell, P.H. (1975)** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- Ochsner, U.A. & Reiser, J. (1995)** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6424-6428.
- Oh, J.I. & Kaplan, S. (2002)** Oxygen adaptation. The role of the CcoQ subunit of the *cbb₃* cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Biol Chem* **277**: 16220–16228.
- Olson, J.C., McGuffie, E.M. & Frank, D.W. (1997)** Effects of differential expression of the 49-kilodalton exoenzyme S by *Pseudomonas aeruginosa* on cultured eukaryotic cells. *Infect Immun* **65**: 248-256.
- Otten, M.F., Stork, D.M., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V. & Van Spanning, R.J. (2001)** Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **268**: 2486–2497.
- Palleroni, N.J. (1992)** Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In: Prokaryotes (Second Edition) **160**: 3071-3085.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. & Iglewski, B.H. (1993)** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**: 1127-1130.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. & Greenberg, E.P. (1994)** Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 197-201.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1995)** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 1490-1494.
- Pereira, M.M., Santana, M. & Teixeira, M. (2001)** A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta* **1505**: 185–208.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C. & Iglewski, B.H. (1997)** Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3127-3132.

- Pessi, G. & Haas, D. (2000)** Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 6940-6949.
- Pitcher, R.S. & Watmough, N.J. (2004)** The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1655**: 388-399.
- Pollack M. (1995)** *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and practice of infectious diseases. (Fourth Edition): 1980-2003. Churchill Livingstone, New York.
- Poole, R.K. & Hughes, M.N. (2000)** New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol.* **36**: 775-783.
- Preisig, O., Anthamatten, D. & Hennecke, H. (1993)** Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3309-3313.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C.A. & Hennecke, H. (1996)** A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **178**: 1532–1538.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A. & Lunardi, J. (2001)** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**: 699-704.
- Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997)** The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**: 309-319.
- Richardson, D.J., King, G.F., Kelly, D.K., McEwan, A.G., Ferguson, S.J. und Jackson, J.B. (1988)** The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Arch Microbiol* **150**: 131-137.
- Richardson, D.J. & Watmough, N.J. (1999)** Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 207-219.
- Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M.T., Römling, U., Groß, U., Doss, M.O., Arai, H., Igarashi, Y. & Jahn, D. (1998)** Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *hemF* and *hemN* by the dual action of the response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* **29**: 985-997.

- Rosqvist, R., Magnusson, K.E. & Wolf-Watz, H. (1994)** Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964-972.
- Rowe, J.J., Ubbink-Kok, T., Molenaar, D., Konings, W.N. & Driessen, A.J. (1994)** NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**: 579-586.
- Sambrook & Russell (2001)** Molecular cloning. A laboratory manual. (Third edition) Cold Spring Harbor Verlag, New York.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J. & Sawa, T. (2003)** The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959-2969.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P. & Frank, D.W. (1999)** Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **5**: 392-398.
- Sawers, R.G. (1991)** Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1469-1481.
- Schneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L. & Ehrenfeucht, A. (1986)** Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* **188**: 415-431.
- Schneider, T.D. & Stephens, R.M. (1990)** Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**: 6097-6100.
- Schneider, T.D. (1996)** Reading of DNA sequence logos: prediction of major groove binding by information theory. *Methods Enzymol* **274**: 445-455.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T. & Greenberg, E.P. (2003)** Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066-2079.
- Scott, C., Partridge, J.D., Stephenson, J.R. & Green, J. (2003)** DNA target sequence and FNR-dependent gene expression. *FEBS Lett* **541**: 97-101.
- Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. & Friedrich, B. (1993)** Structure and function of a periplasmatic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **175**: 5867-5876.

- Silvestrini, M.C., Falcinelli, S., Ciabatti, I., Cutruzzola, F. & Brunori, M. (1994)** *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie* **76**: 641-654.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983)** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-790.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., & Welsh, M.J. (1996)** Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**: 229-236.
- SooHoo, C.K. & Hollocher, T.C. (1991)** Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. *J Biol Chem* **266**: 2203-2209.
- Spiro, S. & Guest, G.R. (1990)** FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **75**: 399-428.
- Stewart, V. (1993)** Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**: 425-434.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W. (2002)** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkmann, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadmann, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. & Olson, V.M. (2000)** Complete gene sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Sun, J. & Barbieri, J.T. (2004)** ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. *J Biol Chem* **279**: 42936-42944.
- Thöny-Meyer, L., Beck, C., Preisig, O. & Hennecke, H. (1994)** The *ccoNOQP* gene cluster codes for a *cb*-type cytochrome oxidase that functions in aerobic respiration of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol* **14**: 705-716.
- Thompson, M.R., Bjorn, M.J., Sokol, P.A., Lile, J.D. & Iglewski, B.H. (1980)** Exoenzyme S: an ADP-ribosyl transferase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Novel ADPribosylations of regulatory enzymes and proteins: 425-433. Elsevier North-Holland, Inc., Amsterdam.

- Tyson, K.L., Bell, A.I., Cole, J.A. & Busby, S.J.W. (1993)** Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol Microbiol* **7**: 151-157.
- Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.G., Wackwitz, B. & Zeuner, Y. (2002)** Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 263-268.
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2001)** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6911-6916.
- Van de Kamp, M., Silvestrini, M.C., Brunori, M., Van Beeumen, J., Hali, F.C. & Canters, G.W. (1990)** Involvement of the hydrophobic patch of azurin in the electron-transfer reactions with cytochrome *c*₅₅₁ and nitrite reductase. *Eur J Biochem* **194**: 109-118.
- Van Delden, C. & Iglewski, B.H. (1998)** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-560.
- Verhoogt, H.J., Smit, H., Abee, T., Gamper, M., Driessen, A.J., Haas, D. & Konings, W.N. (1992)** *arcD*, the first gene of the *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. *J Bacteriol* **174**: 1568-1573.
- Viebrock, A. & Zumft, W.G. (1988)** Molecular cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **170**: 4658-4668.
- Vijgenboom, E., Busch, J.E. & Canters, G.W. (1997)** In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of *rpoS* and ANR. *Microbiology* **143**: 2853-2863.
- Vollack, K.U., Xie, J., Härtig, E., Römmling, U. & Zumft, W.G. (1998)** Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 441-448.
- von Gabain, A., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C. & Cohen, S.N. (1983)** Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 653-657.
- Wada, A., Igarashi, K., Yoshimura, S., Aimoto, S. & Ishihama, A. (1995)** Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 410-417.

- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. & Iglewski, B.H. (2003)** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**: 2080-2095.
- Walker, M.S. & DeMoss, J.A. (1993)** Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed in vitro by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL. *J Biol Chem* **268**: 8391-8393.
- Ward, C.L., Omura, S. & Kopito, R.R. (1995)** Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**: 121-127.
- Wattiau, P. & Cornelis, G.R. (1993)** SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in O₆ secretion of YopE. *Mol Microbiol* **8**: 123-131.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. & Salmond, G.P. (2001)** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
- Wilson, M., Greenwood, C., Brunori, M. & Antonini, E. (1975)** Electron transfer between azurin and cytochrome *c*₅₅₁ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **145**: 449-457.
- Winteler, H.V. & Haas, D. (1996)** The homologous regulators Anr of *Pseudomonas aeruginosa* and Fnr of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology* **142**: 685-693.
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M. & Williams, P. (2000)** The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**: 6401-6411.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C. & Doring, G. (2002)** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas infections* of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**: 317-325.
- Wylie, J.L. & Worobec, E.A. (1995)** The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**: 3021-3026.
- Yahr, T.L., Hovey, A.K., Kulich, S.M. & Frank, D.W. (1995)** Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* **177**: 1169-1178.
- Yahr, T.L., Barbieri, J.T. & Frank, D.W. (1996)** Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 1412-1419.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. & Frank, D.W. (1998)** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.

- Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N. & Ishihama, A. (1993)** Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J* **12**: 625-630.
- Ye, R.W., Haas, D., Ka, J.O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C. & Tiedje, J.M. (1995)** Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* **177**: 3606-3609.
- Zannoni, D. (1989)** The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochim Biophys Acta* **975**: 299-316.
- Zimmermann, A., Reimmann, C., Galimand, M. & Haas, D. (1991)** Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1483-1490.
- Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (1996)** Assembly and function of the cytochrome *cbb₃* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* **271**: 9114-9119.
- Zumft, W.G., Viebrock-Sambale, A. & Braun, C. (1990)** Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. *Eur J Biochem* **192**: 591-599.
- Zumft, W.G. (1997)** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616.
- Zumft, W.G. & Körner, H. (1997)** Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 43-58.

7 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Dieter Jahn für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit bedanken sowie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und exzellenten Laborbedingungen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Max Schobert und Dr. Elisabeth Härtig, die mir stets zu allen Fragen rund um *Pseudomonas aeruginosa* bzw. RNA-Isolierungs- und Aufarbeitungstechniken zur Hilfe standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen *Pseudomonas*-KollegInnen, allen voran Dr. Nicole Quäck, sowie Dr. Martin Eschbach, Dana Heldt, Kerstin Schreiber, Nelli Bös, Jens Fröde und Bea Benkert, für die angenehme Laboratmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Vielen Dank auch an die Protein-, *Bacillus*-, und Bioinformatik-Jahnlinge für die gute Zusammenarbeit und die netten Weihnachts- und sonstigen Feiern.

Ein großes Danke auch an alle TAs, vor allem an Anja Hartmann, Simone Virus und Susanne Kneip, für die Aufrechterhaltung der Laborstrukturen.

Helga Fischer und Martina Heinze danke ich für die Hilfsbereitschaft in allen bürokratisch-verwaltungstechnischen Fragen.

Dr. Jörg Lauber danke ich für die Einführung in die Software MAS 5.0 und Tanja Töpfer für die Hybridisierung der GeneChips.

Der Gruppe um Dr. Lothar Jänsch danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Professor Dr. Kenneth N. Timmis danke ich für die Übernahme des Co-Referats.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die mir während meines Studiums sowie meiner Doktorarbeit zur Seite standen.

Matse danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und ganz besonders für seine Freundschaft.